

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580017434.1

[51] Int. Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月11日

[11] 公开号 CN 1997668A

[22] 申请日 2005.3.29

[21] 申请号 200580017434.1

[30] 优先权

[32] 2004.3.30 [33] GB [31] 0407197.3

[32] 2004.3.30 [33] GB [31] 0407193.2

[86] 国际申请 PCT/GB2005/001147 2005.3.29

[87] 国际公布 WO2005/095457 英 2005.10.13

[85] 进入国家阶段日期 2006.11.28

[71] 申请人 葛兰素集团有限公司

地址 英国梅得塞克斯

[72] 发明人 J·H·埃利斯 A·埃安-杜瓦尔

V·杰马彻维斯基 C·普鲁普顿

N·T·拉普森 M·R·韦斯特

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 梁 谋

权利要求书 8 页 说明书 101 页 序列表 9 页
附图 37 页

[54] 发明名称

免疫球蛋白

[57] 摘要

本发明涉及免疫球蛋白，例如抗体，其特异性结合制瘤蛋白 M(OSM)，特别是人 OSM(hOSM)，并调节 OSM 与 gp130 之间的相互作用。在典型的实施方案中，OSM 被糖基化。本发明还涉及调节 OSM 的位点 II 和位点 III 二者与其对应互作配偶体之间的相互作用的抗体。本发明进一步公开了药用组合物、筛选方法和药物治疗方法。

1. 一种治疗性抗体，其特异性结合 OSM，特别是 hOSM，并调节 OSM 与 gp130 之间的相互作用。
2. 权利要求 1 的抗体，其包含 SEQ. I.D. NO: 3 的 CDRH3。
3. 权利要求 2 的抗体，其进一步包含：
SEQ. I.D. NO: 1 的 CDRH1
SEQ. I.D. NO: 2 的 CDRH2
SEQ. I.D. NO: 4 的 CDRL1
SEQ. I.D. NO: 5 的 CDRL2
SEQ. I.D. NO: 6 的 CDRL3。
4. 权利要求 1 的抗体，其包含 SEQ. I.D. NO: 42 的 CDRH3。
5. 权利要求 4 的抗体，其进一步包含：
SEQ. I.D. NO: 40 的 CDRH1
SEQ. I.D. NO: 41 的 CDRH2
SEQ. I.D. NO: 43 的 CDRL1
SEQ. I.D. NO: 44 的 CDRL2
SEQ. I.D. NO: 45 的 CDRL3。
6. 权利要求 1-5 任一项的抗体，其中所述抗体选自全抗体、嵌合抗体、人源化抗体、双特异性抗体、杂缀合抗体(heteroconjugate)。
7. 权利要求 6 的抗体，其中所述抗体为全抗体。
8. 权利要求 7 的抗体，其中所述全抗体为鼠、大鼠、兔、灵长类动物或人抗体。
9. 权利要求 8 的抗体，其中所述全抗体为人抗体。
10. 权利要求 6 的抗体，其中所述抗体为嵌合抗体或人源化抗体。
11. 权利要求 8 的抗体，其中所述抗体为人源化抗体。
12. 权利要求 2 的人源化抗体，其中人受体可变重链构架区的残基 28、29、30、71 和 94 以及人受体可变轻链构架的 49 和 71 位被 CDRH3

所源自的供体抗体构架中的对应残基所取代。

13. 权利要求 12 的抗体, 其中所述人重链构架包含以下残基(或其保守置换物):

位置	残基
28	S
29	L
30	T
71	K
94	K

所述人轻链包含以下残基(或其保守置换物):

位置	残基
49	E
71	Y

14. 一种特异性结合 hOSM 并调节 hOSM 与 gp130 之间相互作用的人源化治疗性抗体, 其包含 SEQ. I.D. NO: 9 的 V_H 结构域和 SEQ. I.D. NO: 10 的 V_L 结构域。

15. 一种特异性结合 hOSM 并调节 hOSM 与 gp130 之间相互作用的人源化治疗性抗体, 其包含 SEQ. I.D. NO: 11 的重链和 SEQ. I.D. NO: 12 的轻链。

16. 一种特异性结合 hOSM 并调节 hOSM 与 gp130 之间相互作用的人源化治疗性抗体, 其包含 SEQ. I.D. NO: 48 的 V_H 结构域和 SEQ. I.D. NO: 49 的 V_L 结构域。

17. 一种特异性结合 hOSM 并调节 hOSM 与 gp130 之间相互作用的人源化治疗性抗体, 其包含 SEQ. I.D. NO: 50 的重链和 SEQ. I.D. NO: 51 的轻链。

18. 前述任一项权利要求的治疗性抗体, 其进一步包含选自 IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM 的人重链恒定区。

19. 权利要求 18 的治疗性抗体, 其中所述恒定区为 IgG 同种型,

例如 IgG1 或 IgG4 的恒定区。

20. 权利要求 19 的治疗性抗体，其中所述恒定区为 IgG1。

21. 权利要求 20 的治疗性抗体，其中所述恒定区突变，使抗体成为非裂解性的。

22. 前述任一项权利要求的治疗性抗体，其中所述抗体调节 hOSM 的位点 II 与 gp130 之间的相互作用。

23. 权利要求 22 的治疗性抗体，其中所述抗体抑制所述相互作用。

24. 权利要求 23 的治疗性抗体，其中所述抗体阻断所述相互作用。

25. 一种抗原结合片段，其是前述任一项权利要求的治疗性抗体的抗原结合片段。

26. 权利要求 25 的片段，其中所述片段选自：Fab、Fab'、Fd、F(ab)₂、ScFv。

27. 一种药用组合物，其包含前述任一项权利要求的治疗性抗体或其抗原结合片段。

28. 一种治疗罹患对调节 hOSM 与 gp130 之间相互作用有反应的疾病或障碍的人患者的方法，所述方法包含给予所述患者治疗有效量的权利要求 27 的组合物步骤。

29. 一种治疗罹患慢性炎症性疾病或障碍的人患者的方法，所述方法包含给予所述患者治疗有效量的权利要求 27 的组合物步骤。

30. 一种治疗罹患关节炎疾病或障碍的人患者的方法，所述方法包含给予所述患者治疗有效量的权利要求 27 的组合物步骤。

31. 权利要求 30 的方法，其中所述患者罹患类风湿性关节炎和/或骨关节炎。

32. 一种治疗罹患炎性肺病例如哮喘或 COPD 的人患者的方法，所述方法包含给予所述患者治疗有效量的权利要求 27 的组合物步骤。

33. 一种治疗罹患银屑病的人患者的方法, 所述方法包含给予所述患者治疗有效量的权利要求 27 的组合物的步骤。

34. 一种治疗罹患心血管疾病或障碍例如动脉粥样硬化的人患者的方法, 所述方法包含给予所述患者治疗有效量的权利要求 27 的组合物的步骤。

35. 一种治疗罹患卡波西肉瘤的人患者的方法, 所述方法包含给予所述患者治疗有效量的权利要求 27 的组合物的步骤。

36. 权利要求 1-26 中任一项的治疗性抗体或其抗原结合片段在药物生产中的用途, 其中所述药物用于治疗对调节 hOSM 与 gp130 之间相互作用有反应的疾病, 例如类风湿性关节炎、骨关节炎、银屑病、哮喘、COPD。

37. 一种药物, 其包含权利要求 1-20 中任一项的治疗性抗体或其抗原结合片段。

38. 一种编码权利要求 1-26 中任一项的治疗性抗体或其抗原结合片段的重链和/或轻链的载体(例如质粒), 例如所述载体包含权利要求 39-46 中任一项的多核苷酸。

39. 一种编码 SEQ. I.D. NO: 9 的 V_H 结构域的多核苷酸, 所述多核苷酸包含 SEQ. I.D. NO: 17 或基本由其组成。

40. 一种编码 SEQ. I.D. NO: 10 的 V_L 结构域的多核苷酸, 所述多核苷酸包含 SEQ. I.D. NO: 18 或基本由其组成。

41. 一种编码 SEQ. I.D. NO: 11 的重链的多核苷酸, 所述多核苷酸包含 SEQ. I.D. NO: 19 或基本由其组成。

42. 一种编码 SEQ. I.D. NO: 12 的轻链的多核苷酸, 所述多核苷酸包含 SEQ. I.D. NO: 20 或基本由其组成。

43. 一种编码 SEQ. I.D. NO: 48 的 V_H 结构域的多核苷酸, 所述多核苷酸包含 SEQ. I.D. NO: 54 或基本由其组成。

44. 一种编码 SEQ. I.D. NO: 49 的 V_L 结构域的多核苷酸, 所述多核苷酸包含 SEQ. I.D. NO: 55 或基本由其组成。

45. 一种编码 SEQ. I.D. NO: 50 的重链的多核苷酸, 所述多核苷酸包含 SEQ. I.D. NO: 56 或基本由其组成。

46. 一种编码 SEQ. I.D. NO: 51 的轻链的多核苷酸, 所述多核苷酸包含 SEQ. I.D. NO: 57 或基本由其组成。

47. 一种稳定转化或转染的重组宿主细胞, 其包含权利要求 38 的载体。

48. 一种稳定转化或转染的重组宿主细胞, 其包含含 SEQ. I.D. NO: 17 的多核苷酸的第一载体和含 SEQ. I.D. NO: 18 的多核苷酸的第二载体。

49. 一种稳定转化或转染的重组宿主细胞, 其包含含 SEQ. I.D. NO: 19 的多核苷酸的第一载体和含 SEQ. I.D. NO: 20 的多核苷酸的第二载体。

50. 一种稳定转化或转染的重组宿主细胞, 其包含含 SEQ. I.D. NO: 54 的多核苷酸的第一载体和含 SEQ. I.D. NO: 55 的多核苷酸的第二载体。

51. 一种稳定转化或转染的重组宿主细胞, 其包含含 SEQ. I.D. NO: 56 的多核苷酸的第一载体和含 SEQ. I.D. NO: 57 的多核苷酸的第二载体。

52. 权利要求 47-51 中任一项的宿主细胞, 其中所述宿主细胞为脊椎动物细胞。

53. 权利要求 52 的宿主细胞, 其中所述细胞为哺乳动物细胞。

54. 权利要求 53 的宿主细胞, 其中所述细胞为 CHO 或 NS0。

55. 一种生产治疗性抗体或者的方法, 其包括培养权利要求 47-51 中任一项的宿主细胞的步骤。

56. 一种在 ELISA 型实验中竞争性抑制权利要求 15 的治疗性抗体与 OSM、特别是 hOSM、更特别是 hOSM 的位点 II 结合的抗体或抗原结合片段, 前提是所述竞争性抗体不包含 SEQ. I.D. NO: 42 的 CDRH3。

57. 一种药用组合物，其包含权利要求 56 的竞争性抗体。

58. 一种治疗罹患对调节 hOSM 与 gp130 之间相互作用有反应的疾病或障碍(诸如关节炎疾病，例如类风湿性关节炎和/或骨关节炎)的人患者的方法，所述方法包含给予所述患者治疗有效量的权利要求 57 的组合物的步骤。

59. 特异性结合糖基化 hOSM 的蛋白骨架的治疗性抗体(例如权利要求 15 或 17 的抗体)在药物生产中的用途，其中所述药物用于治疗选自以下的疾病或障碍：关节炎疾病，例如类风湿性关节炎、幼年发病性关节炎、银屑病性关节炎、强直性脊柱炎；银屑病，例如慢性斑疾病；炎性肺病，例如 COPD 或重症哮喘；MS；痴呆，例如阿尔茨海默病；疼痛，例如神经性或炎性疼痛；动脉粥样硬化；细胞周期调节疾病，例如癌症(例如前列腺癌)、骨髓瘤。

60. 一种含第一治疗性抗体和第二治疗性抗体的药用组合物，其中第一治疗性抗体特异性结合 hOSM 并调节 hOSM 的位点 II 与 gp130 之间的相互作用，第二治疗性抗体特异性结合 hOSM 并调节 hOSM 的位点 III 与 OSMR β 和/或 LIFR 之间的相互作用。

61. 一种含双特异性治疗性抗体的药用组合物，其中所述双特异性治疗性抗体结合 hOSM，并调节(a) hOSM 的位点 II 与 gp130 之间以及(b) hOSM 的位点 III 与 OSMR β 和/或 LIFR 之间的相互作用。

62. 一种至少含第一拮抗剂的药用组合物，其中所述第一拮抗剂结合 hOSM，并调节(a) hOSM 的位点 II 与 gp130 之间以及(b) hOSM 的位点 III 与 OSMR β 和/或 LIFR 之间的相互作用。

63. 一种至少含第一拮抗剂(诸如蛋白质拮抗剂，例如抗体)的药用组合物，其中所述第一拮抗剂结合 gp130 和/或 OSMR β 和/或 LIFR，并调节(例如抑制或阻断)(a) gp130 与 hOSM 之间以及(b) OSMR β 和/或 LIFR 与 hOSM 之间的相互作用。

64. 一种筛选推定结合 OSM、特别是 hOSM 的抗体(例如针对 OSM/hOSM 产生的抗体)的方法，该方法包括；

(a) 在允许结合的条件下温育所述抗体和糖基化 OSM、特别是糖基化 hOSM;

(b) 测量所述抗体的结合亲和力;

(c) 如果所述抗体具有的结合亲和力高于 $1 \mu\text{M}$, 通常高于 100 nM , 则选择所述抗体;

(d) 提供步骤(c)的所述抗体的编码多核苷酸, 并用含所述多核苷酸的载体转化或转染哺乳动物宿主细胞;

(e) 在允许所述抗体分泌入培养基中的条件下培养步骤(d)的所述宿主细胞;

(f) 可选地纯化步骤(e)的培养基;

(g) 将步骤(e)或(f)的抗体加入到药用组合物中。

65. 一种筛选推定结合 OSM、特别是 hOSM 的抗体(例如针对 OSM/hOSM 产生的抗体)的方法, 该方法包括;

(a) 在允许结合的条件下温育所述抗体和糖基化 OSM、特别是糖基化 hOSM;

(b) 测量所述抗体的结合亲和力;

(c) 如果所述抗体具有的结合亲和力高于 $1 \mu\text{M}$, 通常高于 100 nM , 则选择所述抗体。

66. 权利要求 64 或 65 任一项的方法, 其中所述 OSM 已由哺乳动物宿主细胞例如 CHO 糖基化。

67. 权利要求 64 或 65 的方法, 其中所述 hOSM 是天然糖基化 hOSM。

68. 权利要求 67 的方法, 其中所述 hOSM 已由人特别是罹患关节炎疾病例如 RA 的人滑液中分离出来。

69. 一种抗体, 其为由权利要求 65-68 任一项的方法鉴别出的抗体。

70. 一种药用组合物, 其包含权利要求 69 的抗体和药用惰性载体。

71. 权利要求 1 的治疗性抗体，其除了能够结合 hOSM 以外，还能够结合 cOSM。

72. 一种检测生物样品、特别是人滑液或人血清中的 hOSM 的方法，该方法包括在 ELISA 型实验中使用位点 III 抗体作为捕获抗体。

73. 权利要求 72 的方法，其中所述 ELISA 型实验基本如实施例 16 所述。

免疫球蛋白

发明领域

本发明涉及免疫球蛋白，其特异性结合制瘤蛋白 M (OSM)，特别是人 OSM (hOSM)。更具体地说，本发明涉及特异性结合 hOSM 的抗体。本发明还涉及用所述免疫球蛋白治疗疾病或障碍的方法、含所述免疫球蛋白的药用组合物以及生产方法。由下文的描述显而易见本发明的其它方面。

发明背景

制瘤蛋白 M 是一种 28 KDa 的糖蛋白，属于细胞因子的白介素 6 (IL-6) 家族，该家族包含 IL-6、白血病抑制因子(LIF)、睫状神经营养因子(CNTF)、心肌营养蛋白-1 (CT-1)和心肌营养蛋白-1 样细胞因子(参见 Kishimoto T 等(1995) Blood 86: 1243-1254)，它们共用 gp130 跨膜信号转导受体(参见 Taga T 和 Kishimoto T (1997) Annu. Rev. Immunol. 15: 797-819)。OSM 最初因其抑制黑素瘤细胞系 A375 生长而被发现(参见 Malik N (1989)等, Mol Cell Biol 9: 2847-2853)。随后，发现了更多作用，发现其是类似于 IL-6 家族其它成员的多功能介导体。OSM 在各种细胞类型中产生，包括巨噬细胞、活化 T 细胞(参见 Zarling JM (1986) PNAS (USA) 83: 9739-9743)、多形核嗜中性粒细胞(参见 Grenier A 等(1999) Blood 93: 1413-1421)、嗜酸性粒细胞(参见 Tamura S 等(2002) Dev. Dyn. 225: 327-31)、树突细胞(参见 Suda T 等(2002) Cytokine 17: 335-340)。其存在于胰腺、肾、睾丸、脾、胃和脑(参见 Znoyko I 等(2005) Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 283: 182-186)以及骨髓(参见 Psenak O 等(2003) Acta Haematol 109: 68-75)中。其主要生物作用包括活化内皮(参见 Brown TJ 等(1993) Blood 82: 33-7)、激活急性期反应(参见 Benigni F 等(1996) Blood 87: 1851-1854)、诱导

细胞增殖或分化、调节炎性介导体释放和造血作用(参见 Tanaka M 等 (2003) 102: 3154-3162)、骨重建(参见 de Hooge ASK (2002) Am J Pathol 160: 1733-1743)以及促进血管生成(参见 Vasse M 等(1999) Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 1835-1842)和伤口愈合。

OSM 受体(OSM 受体 β , “OSMR β ”)在广泛细胞上表达, 包括上皮细胞、软骨细胞、成纤维细胞(参见 Langdon C 等 (2003) J Immunol 170: 548-555)、神经元、平滑肌、淋巴结、骨、心脏、小肠、肺和肾脏(参见 Tamura S 等(2002) Mech Dev 115: 127-131)以及内皮细胞。若干方面的证据提示, 内皮细胞是 OSM 的主要靶。这些细胞在用 OSM 刺激后表达 10-20 倍高数量的高亲和性和低亲和性受体, 展现出意义深远且长期的表型改变(参见 Modur V 等(1997) J Clin Invest 100: 158-168)。另外, OSM 是 Kaposi 肉瘤细胞的主要自分泌生长因子, Kaposi 肉瘤细胞被认为是内皮起源(参见 Murakami-Mori K 等(1995) J Clin Invest 96: 1319-1327)。

和其它 IL-6 家族细胞因子一样, OSM 结合跨膜信号转导糖蛋白 gp130。gp130 细胞因子的关键特征是形成寡聚受体复合物, 其包含 gp130 和一种或多种取决于配体的共受体(综述于 Heinrich PC 等(2003) Biochem J. 374: 1-20)。因此, 根据所形成受体复合物的组成, 这些细胞因子在体外和体内均可介导共有的和独特的生物活性。人 OSM (hOSM)和其它 IL-6 细胞因子的差别在于, 其可与 gp130 以及两种共受体 LIFR 或制瘤蛋白受体(OSMR)中的任一种形成复合物。图 1 图解了 hOSM 与 gp130、LIFR 和 OSMR 之间的相互作用。业已破解了 hOSM 的晶体结构, 表明该结构含 4 个 α 螺旋束和 2 个潜在糖基化位点。已通过对 hOSM 分子定点诱变鉴别出两个独立的配体结合位点(参见 Deller MC 等(2000) Structural Fold Des. 8: 863-874)。第一个称为位点 II (有时称为“位点 2”), 其与 gp130 相互作用, 第二个位点称为位点 III (有时称为“位点 3”), 在相反分子末端, 其与 LIFR 或 OSMR 相互作用。诱变实验表明, LIFR 和 OSMR 的结合位点几乎相同, 但

单个氨基酸突变可区分二者。

OSM 作为前体蛋白被合成，前体蛋白包含 25 个氨基酸(AA)的疏水 N 端信号序列和 33 个氨基酸的 C 端前肽，这二者被切割，产生成熟 OSM。OSM 前体蛋白确实具有生物活性，但通过切割 C 端前肽显著增加了活性(参见 Bruce A.G.等(1992) *Prog. Growth Factor Res.* 4: 157-170, Malik N 等(1989) *Mol. Cell Biol.* 9: 2847-2853)。业已将 OSM 描述为“紧凑的柱型分子”，具有约 $20\text{\AA}\times 27\text{\AA}\times 56\text{\AA}$ 的维度。有 4 个 α 螺旋区(螺旋 A 10-37 AA, 螺旋 B 67-90 AA, 螺旋 C 105-131 AA 和螺旋 D 159-185 AA, AA 编号在除去信号序列后开始)。螺旋 A 和 C 包含“扭折”。螺旋通过两个突出环(AB 环 38-66 AA, CD 环 130-158 AA)连接，排列成两个反平行对(A-D 和 B-C)。(参见 Deller M.C 等(2000) *Structure* 8; 863-874)。

OSM 经位点 II 结合 gp130 似乎可使另一个 OSM 分子通过位点 III 相互作用而结合 gp130。OSM 还通过位点 III 结合 LIFR 或 OSMR。因此，OSM 与其受体形成复合物，该复合物由 1 个 gp130、1 个 LIFR 或 OSMR 以及 2 个 OSM 分子构成。(参见 Sporeno E (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 10991-10995, Staunton D 等(1998) *Prot. Engineer* 11: 1093-1102 和 Gearing D.P (1992) *Science* 225: 306-312)。

利用诱变发现，对于位点 II OSM-gp130 结合而言，重要的残基是 Gln20、Gly120、Gln16 和 Asn124。对于位点 III OSM-OSMR 结合而言，重要的残基是 Phe160 和 Lys163。因此，OSM 位点 II 相互作用依赖于 hOSM 上的 Gln20、Gly120、Asn124，并较低程度地依赖于 hOSM 上的 Gln16。已在 gp130 中鉴别出 3 个互补残基(Phe169、Tyr196 和 Glu282)在 OSM 和 gp130 相互作用中特别值得注意。(参见 Deller M 等(2000) *Structure* 8: 863-874, Aasland D 等(2002) *J. Mol. Biol.* 315: 637-646, Timmermann A 等(2000) *FEBS Lett.* 468 : 120-124)。

SEQ. I.D. NO: 13 列出了由 1 位开始的 hOSM 氨基酸序列。

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQD
 TSRLLDPYIRIQGLDVPKLRHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNAT
 LGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLOMARPNILGLRNNIYCM
 AQLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHG YHRFMHS
 VGRVFSKWGESPNRSRRHS PHQALRKGVRRT RPSRKGKRLMTRGQLPR.

(SEQ. I.D. NO: 13)

特别要注意的位点 II 残基以粗体突出显示，并加下划线。

SEQ. I.D. NO: 14 列出了编码 hOSM 的 cDNA。

ATGGGGGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTC
 CTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCGGCTATAGGCAGCTGCTCGAAAGAG
 TACCGCGTGCTCCTTGGCCAGCTCCAGAAGCAGACAGATCTCATGCAGGAC
 ACCAGCAGACTCCTGGACCCCTATATACGTATCCAAGGCCTGGATGTTCCCT
 AAAC TGAGAGAGCACTGCAGGGAGCGCCCCGGGGCCTTCCCCAGTGAGGAG
 ACCCTGAGGGGGCTGGGCAGGCGGGGCTTCTGCAGACCCTCAATGCCACA
 CTGGGCTGCGTCCTGCACAGACTGGCCGACTTAGAGCAGCGCCTCCCCAAG
 GCCCAGGATTTGGAGAGGTCTGGGCTGAACATCGAGGACTTGGAGAAGCTG
 CAGATGGCGAGGCCGAACATCCTCGGGCTCAGGAACAACATCTACTGCATG
 GCCCAGCTGCTGGACAACCTCAGACACGGCTGAGCCCACGAAGGCTGGCCGG
 GGGCCTCTCAGCCGCCACCCCCACCCCTGCCTCGGATGCTTTTCAGCGC
 AAGCTGGAGGGCTGCAGGTTCTGCATGGCTACCATCGCTTCATGCACTCA
 GTGGGGCGGGTCTTCAGCAAGTGGGGGGAGAGCCCGAACCGGAGCCGGAGA
 CACAGCCCCCACCAGGCCCTGAGGAAGGGGGTGCAGCAGGACCAGACCCCTCC
 AGGAAAGGCAAGAGACTCATGACCAGGGGACAGCTGCCCCGGTAG

(SEQ. I.D. NO: 14)

类风湿性关节炎(RA)包括一组截然不同但内在相关的病理过程的症候群。这些病理过程为：局部和系统炎症、滑膜细胞增殖、导致形成血管翳组织的血管生成和基质沉积，血管翳组织侵袭和破坏软骨和骨，产生变形和残疾。该病理的基础是由进入并继续停留在发炎关节中的细胞和内源关节组织细胞长期释放细胞因子和炎性介导体(参见 Firestein G (2003)载于 Rheumatology. Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt 和 Weisman 编辑. Pub. Mosby. 855-884)。RA 中的起始事件是未知的，但大量证据表明，它们涉及外源或自体的“自身”抗原激活 T 淋巴细胞(参见 Firestein G (2004) J Clin Invest 114: 471-4)。一旦它们被启动，则保持病程进行所需 T 细胞的程度也是不确定的，尽管特异性靶向 T 细胞的治疗剂如 CTLA4Ig 可能对晚期疾病有效(参

见 Kremer JM 等(2003) *New Engl J Med* 349: 1907-15, Moreland L 等(2004) Annual meeting of the American College of Rheumatology Abstract 1475)。

在类风湿性滑膜炎发展中的最早事件包括单核和多形核细胞募集,以穿过滑膜-衬细胞层毛细管中的内皮。多形体迁移入滑液(SF)中,而淋巴细胞保持在毛细管邻近,其随后可组织化为异位淋巴滤泡。这种免疫细胞流入之后是成纤维细胞样滑膜细胞(FLS)增殖。与其正常对应物不同,RA FLS 似乎避开了引起增殖和凋亡停滞的调节过程,导致其持续累积(参见 Yamanishi Y 等(2004) *Arthritis Res Ther* 7: 12-18)。而且,新出现的血管翳组织现在生出由胞外基质支持的新血管,以允许其进一步扩展。该过程涉及成纤维细胞增殖、基质重建和血管生成,非常类似于不受控的伤口愈合事件。单核细胞迁移入发展中的血管翳组织中,并经历分化,成为具有慢性活化表型的巨噬细胞。同样,B 细胞经历终末分化,形成长寿命浆细胞,其分泌包括类风湿因子在内的抗体。发炎的滑膜维持骨髓细胞和淋巴细胞局部分化的能力部分地基于生长因子(例如 GM-CSF 和 IL-6)的局部产生。FLS 和固有的单核白细胞均释放可溶性因子,其刺激炎性细胞由血液进一步募集,并在紧急情况下驱动病程中的下一步—破坏关节软骨和骨重建。血管翳组织是侵袭性的。其前沿分泌破坏性酶例如 MMP 和改变细胞(其保持软骨和骨结构完整性)表型的细胞因子。结果,蛋白聚糖丢失,II 型胶原蛋白不可逆地被切割,导致软骨弱化和丢失。骨也经历许多影响深远的变化,包括病灶糜烂、软骨下骨质疏松。最终,这些变化导致在晚期 RA 中观察到的关节特征性变形和半脱位(参见 Gordon D 和 Hastings D (2003)载于 *Rheumatology*. Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt 和 Weisman 编辑, Pub. Mosby. 765-780)。

RA 是系统性疾病,可能是由于炎性介导体由关节进入血液中而产生。这影响机体内的许多器官系统,包括皮肤、眼、肝、肾、脑

和血管衬细胞, 导致发病率和死亡率增加(参见 Matteson EL (2003)载于 Rheumatology. Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt 和 Weisman 编辑, Pub. Mosby. 781-792)。大部分死亡率过高是由于动脉粥样硬化引起的心血管疾病, 因为类风湿性滑膜炎发展所涉及的许多病理过程都有动脉粥样硬化斑形成。

RA 治疗的目标在于控制疼痛、减轻炎症和阻滞导致组织破坏的过程。传统上, 用非甾族抗炎性药物(NSAIDS)、低剂量类固醇和所谓的改善病情的抗风湿药物(DMARDS)治疗 RA。效力水平低、发作慢、毒性、耐受性差和随时间进展抗性增加影响了这些治疗(包括氨甲喋呤(MTX)、柳氮磺胺吡啶、金制剂和来氟米特)的应用。新近, 引进抑制细胞因子肿瘤坏死因子(TNF)的生物药物(例如 Enbrel™、Remicade™和 Humira™)已有重大进展(参见 Roberts L 和 McColl GJ (2004) Intern Med J 34: 687-93)。

因此, 本发明的目标是提供一种治疗 RA 以及其它疾病和障碍的治疗方法, 所述其它疾病和障碍具体地说是慢性炎性疾病和障碍, 例如骨关节炎和银屑病。具体地说, 本发明的目标是提供免疫球蛋白, 特别是特异性结合 OSM (例如 hOSM, 具体地说是其位点 II)和在疾病和障碍治疗中调节(即抑制或阻断) OSM 与 gp130 之间的相互作用的抗体, 其中所述疾病和障碍对该相互作用的调节有反应。

有越来越多的证据支持以下假设: 调节 OSM-gp130 相互作用可能对治疗这样的疾病和障碍有益。

临床证据

OSM 存在于人 RA 患者的 SF 中(参见 Hui W 等(1997) 56: 184-7)。这些水平与以下参数相关: SF 中的嗜中性粒细胞数、SF 中的 TNF α (有时为“TNF”)水平以及软骨破坏标记物(Manicourt DH 等(2000) Arthritis Rheum 43: 281-288)。而且, RA 患者的滑膜组织自发地离体分泌 OSM (参见 Okamoto H 等(1997) Arthritis and Rheumatism 40: 1096-1105)。

还已表明, OSM 存在于滑液巨噬细胞中(Cawston TE 等(1998) *Arthritis Rheum* 41: 1760-1771), 如较早前所述, OSM 受体和 gp130 在内皮细胞、滑膜成纤维细胞、软骨细胞和成骨细胞上表达。而且, 浸润动脉粥样硬化斑和主动脉瘤的细胞表达 OSM, 这提示该细胞因子与慢性炎症有关联(参见 Mirshahi F 等(2001) *Ann NY Acad Sci* 936: 621-4)。

体外证据

内皮细胞表达的 OSM 受体数量是其它细胞类型的 10-20 倍(参见 Brown TJ 等(1991) *J Immunol* 147: 2175-2180, Linsley PS 等(1989) *J Biol Chem* 264: 4282-4289)。OSM 单独地或与其它细胞因子结合协同地活化内皮, 以释放细胞因子和趋化因子, 并结合嗜中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞, 介导其外渗入滑膜组织中(参见 Modur V 等(1997) *J Clin Invest* 100: 158-168)。还已经表明, OSM 为血管生成(参见 Vasse M 等(1999) *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 19: 1835-1842)和滑膜成纤维(FLS)细胞活化和增殖(因此有利于形成血管翳组织、释放 IL-6、MMP)的有效刺激剂, 并与 TNF 和 IL-1 协同起作用, 诱导该介导体释放(参见 Langdon C 等(2000) *Am J Pathol* 157: 1187-1196)。还已经表明, OSM (与 IL-1)诱导软骨释放胶原蛋白和蛋白聚糖(参见 Cawston T 等(1995) *Biochem Biophys Res Commun* 215: 377-385)。而且, OSM 诱导肝细胞急性期蛋白释放和生产 IL-6 受体(参见 Cichy J 等(1997) *J Immunol* 159: 5648-5643, Kurash JK (2004) *Exp Cell Res* 292: 342-58), 因此可能有助于类风湿性炎症(包括疲劳)的系统作用。另外, OSM 在体外诱导破骨细胞分化和活性(参见 Palmqvist P 等(2002) *J Immunol* 169: 3353-3362)。

体内证据

在正常小鼠的关节中腺病毒表达鼠 OSM (mOSM)产生严重的炎

症和侵蚀性关节炎(参见 Langdon C 等(2000) Am J Pathol 157: 1187-1196)。同样,在缺乏 TNF、IL-1、IL-6 和 iNOS 的敲除小鼠中,在腺病毒传递 mOSM 后,也观察到侵蚀性疾病(参见 de Hooge ASK 等(2003) Arthritis and Rheumatism 48: 1750-1761),这表明 OSM 可介导关节炎病理的所有方面。使用腺病毒表达的 mOSM 载体表达小鼠 OSM 引起幼年特发性关节炎特有的生长板损伤(参见 de Hooge ASK 等(2003) Arthritis and Rheumatism 48: 1750-1761)。在胶原蛋白诱发性关节炎的实验模型中,治疗性给予小鼠抗 OSM 抗体可预防疾病整体进一步演进。当预防性给予具有降植烷诱发性关节炎的小鼠(使人联想人疾病的复发/复原模型)抗 OSM 时,观察到相似的结果(参见 Plater-Zyberk C 等(2001) Arthritis and Rheumatism 44: 2697-2702)。在猴中,皮下注射 OSM 诱发急性期反应和局部慢性炎症(参见 Loy JK 等(1999) Toxicol Pathol 27: 151-155)。业已表明,OSM 当注射入山羊关节中时,诱发单核和 PMN 浸润以及蛋白聚糖释放(参见 Bell MC 等(1999) Arthritis Rheum 42: 2543-2551)。mOSM 在小鼠淋巴结中的转基因过表达引起胸腺外 T 细胞成熟、记忆 T 细胞增殖以及不能排除自身免疫 T 细胞(参见 Louis I 等(2003) Blood 102: 1397-1404)。OSM 在胰腺中的转基因过表达引起与晚期 RA 滑膜中观察到的情况相类似的广泛纤维化(参见 Malik N 等(1995) Mol Cell Biol 15: 2349-2358)。

在 WO99/48523 中,我们公开了 OSM 拮抗剂在炎性疾病和障碍治疗中的用途。其公开内容在鼠关节炎模型中使用抗鼠 OSM 抗体。

在本说明书中公开的所有专利和参考文献都明确和完整地在此引入作为参考。

发明概述

本发明的发明人假定,用特异性结合 hOSM 的抗体调节(特别是阻断)hOSM 的位点 II 与 gp130 之间的相互作用,将调节所有潜在 OSM 受体复合物信号转导,将该细胞因子的生物活性有效中和至治疗

显著程度。尽管如此，但本发明的发明人发现，同时封闭 hOSM 的位点 II 和位点 III 令人惊奇地提升该细胞因子的中和。而且，本发明的发明人发现，hOSM 糖基化在 hOSM 和特异性结合 hOSM 的抗体之间的结合事件中起意想不到的作用。

本发明因此提供特异性结合 hOSM 并与 hOSM 的位点 II 相互作用的治疗性抗体 15E10 或 10D3 (其可为嵌合抗体、人抗体、人源化抗体、双特异性抗体或其抗原结合片段)。参见下表 A。

在本发明的一个实施方案中，提供特异性结合 hOSM 并调节(即抑制或阻断) hOSM 的位点 II 与 gp130 之间相互作用的治疗性抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中，治疗性抗体或其抗原结合片段特异性结合 hOSM 的位点 II。

在另一个实施方案中，提供特异性结合 hOSM 的治疗性抗体或其抗原结合片段，其包含以下的 CDRH3: SEQ. I.D. NO: 3 或 SEQ. I.D. NO: 42。

在本发明的另一个实施方案中，提供特异性结合 hOSM 的治疗性抗体或其抗原结合片段，其包含以下的 CDR:

CDRH1: SEQ. I.D. NO: 1

CDRH2: SEQ. I.D. NO: 2

CDRH3: SEQ. I.D. NO: 3

CDRL1: SEQ. I.D. NO: 4

CDRL2: SEQ. I.D. NO: 5

CDRL3: SEQ. I.D. NO: 6

在本发明的另一个实施方案中，提供特异性结合 hOSM 的治疗性抗体或其抗原结合片段，其包含以下的 CDR:

CDRH1: SEQ. I.D. NO: 40

CDRH2: SEQ. I.D. NO: 41

CDRH3: SEQ. I.D. NO: 42

CDRL1: SEQ. I.D. NO: 43

CDRL2: SEQ. I.D. NO: 44

CDRL3: SEQ. I.D. NO: 45

在整个此说明书中，术语“CDR”、“CDRL1”、“CDRL2”、“CDRL3”、“CDRH1”、“CDRH2”、“CDRH3”遵循在 Kabat 等; *Sequences of proteins of Immunological Interest* NIH, 1987 中提出的 Kabat 编码系统。因此，以下定义了本发明的 CDR:

CDR: 残基

CDRH1: 31-35B

CDRH2: 50-65

CDRH3: 95-102

CDRL1: 24-34

CDRL2: 50-56

CDRL3: 89-97

在本发明的另一个实施方案中，提供鼠治疗性抗体或其抗原结合片段，其包含具有序列: SEQ. I.D. NO: 7 的 V_H 结构域和具有序列: SEQ. I.D. NO: 8 的 V_L 结构域。

在本发明的另一个实施方案中，提供鼠治疗性抗体或其抗原结合片段，其包含具有序列: SEQ. I.D. NO: 46 的 V_H 结构域和具有序列: SEQ. I.D. NO: 47 的 V_L 结构域。

在本发明的一个实施方案中，提供人源化治疗性抗体或其抗原结合片段，其包含具有 SEQ. I.D. NO: 9 所列序列的 V_H 链和具有 SEQ. I.D. NO: 10 所列序列的 V_L 结构域。

在本发明的一个实施方案中，提供人源化治疗性抗体或其抗原结合片段，其包含具有 SEQ. I.D. NO: 48 所列序列的 V_H 链和具有 SEQ. I.D. NO: 49 所列序列的 V_L 结构域。

在本发明的另一个实施方案中，提供人源化治疗性抗体，该抗体包含具有 SEQ. I.D. NO: 11 所列序列的重链和具有 SEQ. I.D. NO: 12 所列序列的轻链。

在本发明的另一个实施方案中，提供人源化治疗性抗体，该抗体包含具有 SEQ. I.D. NO: 50 所列序列的重链和具有 SEQ. I.D. NO: 51 所列序列的轻链。

在本发明的另一个实施方案中，提供人源化治疗性抗体或其抗原结合片段，其调节(即抑制或阻断) hOSM 与 gp130 之间的相互作用。

在本发明的另一个实施方案中，提供含 SEQ. I.D. NO: 7 或 SEQ. I.D. NO: 9 或 SEQ. I.D. NO: 46 或 SEQ. I.D. NO: 48 或基本由其组成的抗体的分离的 V_H 结构域。

在本发明的另一个实施方案中，提供含选自以下的 V_H 结构域的治疗性抗体或其抗原结合片段: SEQ. I.D. NO: 7、SEQ. I.D. NO: 9、SEQ. I.D. NO: 46、SEQ. I.D. NO: 48。

在本发明的另一个实施方案中，提供治疗性抗体或其抗原结合片段，其竞争性抑制含 SEQ. I.D. NO: 3 的 CDRH3 的治疗性抗体的结合。

在本发明的另一个实施方案中，提供治疗性抗体或其抗原结合片段，其竞争性抑制含 SEQ. I.D. NO: 1、2、3、4、5 和 6 的 CDR 的治疗性抗体与 hOSM 的结合。

在另一个实施方案中，提供治疗性抗体或其抗原结合片段，其竞争性抑制含 SEQ. I.D. NO: 11 重链和 SEQ. I.D. NO: 12 轻链的治疗性抗体与 hOSM 的结合。

在本发明的另一个实施方案中，提供治疗罹患疾病或障碍的人患者的方法，其中所述疾病或障碍对 hOSM 与 gp130 之间相互作用的调节有反应，该方法包含给予所述患者治疗有效量的本文所述治疗性体或其抗原结合片段的步骤。

在本发明的另一个实施方案中，提供治疗罹患炎性疾病或障碍的人患者的方法，该方法包含给予所述患者治疗有效量的本文所述治疗性体或其抗原结合片段的步骤。

在本发明的另一个实施方案中，提供治疗罹患关节炎疾病(特别

是类风湿性关节炎、幼年发病性关节炎或骨关节炎)的人患者的方法,该方法包含给予所述患者治疗有效量的本文所述治疗性体或其抗原结合片段的步骤。

在本发明的另一个实施方案中,提供在罹患(或敏于)软骨降解的人患者中减轻或预防此降解的方法,该方法包含给予所述患者治疗有效量的本文所述治疗性体或其抗原结合片段的步骤。

在本发明的另一个实施方案中,提供在罹患疾病或障碍的患者中降低 TNF α 产生的方法,其中所述疾病或障碍对 TNF α 减少有反应,该方法包含给予所述患者治疗有效量的本文所述治疗性体或其抗原结合片段。

在本发明的另一个实施方案中,提供治疗关节炎疾病或障碍的关节外表现的方法,该方法包含给予被关节炎疾病或障碍的关节外表现所困扰的人患者治疗有效量的本文所述治疗性体或其抗原结合片段的步骤。

在本发明的另一个实施方案中,提供治疗罹患内皮细胞源疾病的人患者的方法,该方法包含给予所述患者治疗有效量的本文所述治疗性体或其抗原结合片段的步骤。

本发明还提供本文所述治疗性体或其抗原结合片段在本文所述疾病和障碍的治疗药物生产中的用途。

在本发明的另一个实施方案中,提供本文所述治疗性体或其抗原结合片段的生产方法。

在本发明的另一个实施方案中,提供研究 OSM (特别是 hOSM)和互作配偶体(例如 gp130、LIFR、OSMR)之间相互作用的实验(特别是 ELISA 实验),该实验包含提供糖基化 OSM 样品(通常利用脊椎动物宿主细胞(例如哺乳动物宿主细胞)糖基化,例如 CHO 糖基化)用于所述研究的步骤。

在本发明进一步的实施方案中,我们提供特异性结合天然糖基化 hOSM 并调节(即抑制或阻断)天然糖基化 hOSM 和选自 gp130、

LIFR、OSMR β 的互作配偶体之间相互作用的治疗性抗体。

我们进一步提供含治疗性抗体的药用组合物的生产方法，其中所述治疗性抗体特异性结合 hOSM 并调节(即抑制或阻断) hOSM 与 gp130 之间的相互作用，该方法包含以下步骤：

- (a) 提供候选抗体；
- (b) 提供糖基化 OSM (特别是由重组转化或转染的哺乳动物宿主细胞(例如重组转化的 CHO 细胞)产生的 hOSM 和/或天然糖基化 hOSM)；
- (c) 在允许结合的条件下使步骤(a)的抗体与步骤(b)的 hOSM 接触；
- (d) 测定步骤(c)的抗体是否调节 hOSM 与 gp130 之间的相互作用；
- (e) 可选地使步骤(a)或(d)的所述抗体人源化；
- (f) 将步骤(d)或(e)的所述抗体加入到药用组合物中。

由下文描述显而易见本发明的其它方面、目标和优势。

附图简述

图 1 是一幅示意图，图解了 OSM 与 gp130、LIFR 和 OSMR β 之间的相互作用。

图 2 图解了按照下文实施例提出的使用 15E10 和 10D3 嵌合抗体的方案使用 hOSM (上图)和 cOSM (下图)的 gp130 抑制 ELISA。关于进一步的详述，参见下文描述。

图 3 图解了按照使用实施例的 15E10 和 10D3 嵌合抗体的实施例方案使用 hOSM (上图)和 cOSM (下图)的 KB 细胞实验。

图 4 图解了抗 hOSM (上图)和 cOSM (下图)的 gp130 抑制 ELISA，其中对随 4 种人源化抗体(B1L1、B1L2、B4L1、B4L2)和嵌合抗体 15E10 的抗体浓度而变化的抑制百分率作图。

图 5 图解了实施例的 gp130 抑制 ELISA，其中对比各种人源化

抗体(B2L2、B3L2、B4L2)和嵌合抗体 15E10 对 CHO 产生的 hOSM 的结合。

图 6 图解了使用 cOSM 代替 hOSM 的图 5 实验。

图 7 图解了使用 CHO 生产的 hOSM 的 25%人 AB 血清溶液的图 5 实验。

图 8 图解了使用 cOSM 代替 hOSM 的图 7 实验。

图 9 图解了使用人源化抗体 B2L2、B3L2、B4L2 和嵌合抗体 15E10 的 4 种不同人样品的嗜中性粒细胞 OSM 的 gp130 抑制 ELISA。

图 10 图解了使用抗分离自人 RA 患者滑液的 hOSM 的 3 种人源化抗体(B2L2、B3L2 和 B4L2)和 15E10 嵌合抗体的 gp130 抑制 ELISA。

图 11-16 图解了以 KB 细胞实验代替 gp130 抑制 ELISA 的图 5-10 条件下的结果，例外之处是图 15 的嗜中性粒细胞 OSM 的 KB 细胞实验使用嗜中性粒细胞 OSM 的单个人样品。因此，图 11 图解了 CHO 生产的 hOSM 的 KB 实验，图 12 图解了 CHO 生产的 cOSM 的 KB 实验，图 13 图解了 CHO 生产的 hOSM 的 25%人 AB 血清溶液的 KB 实验，图 14 图解了 CHO 生产的 cOSM 的 25%人 AB 血清溶液的 KB 实验，图 15 图解了嗜中性粒细胞 OSM 的 KB 实验，图 16 图解了分离自 RA 患者 SF 细胞的 OSM 的 KB 实验。

图 17 图解了抗 CHO 产生的 hOSM 的亲代鼠 15E10、嵌合抗体 15E10、人源化抗体构建物 B3L2 和 B3L2 的 Fc 裂解突变体的 gp130 抑制 ELISA。关于更详细的情况，参见描述。

图 18 图解了使用 cOSM 的图 17 实验。

图 19 图解了抗 CHO 生产的 hOSM 的亲代鼠 15E10、15E10 嵌合抗体、人源化构建物 B3L2 和 B3L2 的 Fc 裂解突变体的 KB 细胞实验。

图 20 是一幅示意图，图解了实施例的竞争实验。

图 21 图解了实施例的鼠 10D3 竞争抗体对 15E10 (B3L2 人源化构建物)的抑制。等摩尔浓度(0.15 $\mu\text{g/ml}$)的 10D3 竞争物对 15E10 的

抑制百分率：62.3%。

图 22a 图示了在使用非糖基化 OSM 的 gp130-OSM ELISA 中的典型标准曲线，其中用于包被 ELISA 板的 gp130 浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ 。

图 22b 表明，当将用于包被板的 gp130 浓度增加至 4 $\mu\text{g/ml}$ 时，gp130-OSM ELISA 的灵敏度增加。

图 22c 图解了用糖基化和非糖基化 OSM 二者进行的 gp130-OSM ELISA。非糖基化 OSM：实心圆；糖基化 OSM：空心三角。注意到对非糖基化 OSM 的 ELISA 灵敏度较高，这可能是糖基化掩蔽了所用的检测抗体所识别的表位的结果。

图 23a 图解了 OSM 中和抗体 Mab295 (R&D Systems) 在 gp130-OSM ELISA 中的作用。单独的 OSM：空心圆；OSM+Mab296：实心三角；OSM+Mab295 但在 ELISA 板上没有 gp130：实心正方形。

图 23b 是 Mab295 如何可以在 gp130-OSM ELISA 中加强 OSM 信号的示意图。

图 24 图示了 KB 细胞实验的数据，显示了 Mab 295 中和 OSM 的有效性。以 1 ng/ml 单独的 OSM 或在实验前与各种浓度的 Mab295 混合的该浓度 OSM 刺激细胞。单独的 OSM：实心三角；OSM+Mab295：空心圆；无 OSM 刺激：实心正方形。

图 25 图解了 OSM 位点 III 特异性抗体 OM4-11.31 在 gp130-OSM ELISA 中的作用。单独的 OSM：空心圆；OSM+同种型对照 IgG：实心倒三角；OSM+位点 II OSM 特异性抗体：空心正方形；OSM+OM4-11.31：实心圆。

图 26 图解了位点 II 特异性 OSM 抗体 OM4-5.3 对 OSM 和位点 III 特异性抗体(OM4-11.17)的复合物与 gp130 结合的抑制。12.5 ng/ml 单独的 OSM：实心条棒；OSM+OM4-11.17：对角线条棒；OSM+OM4-11.17+对照 IgG：网状线条棒；OSM+OM4-11.17+OM4-5.3：点画条棒。

图 27 图解了使用 gp130-OSM ELISA 检测的位点和非位点 II 特

异性 OSM 抗体在用人 OSM 免疫的小鼠血清中的出现情况。在用人 OSM 第一次、第二次和第三次加强(分别为 a、b 和 c)后分析血清。OSM+免疫前血清: 空心圆; OSM+免疫小鼠抗血清: 实心倒三角; OSM+免疫小鼠抗血清但在 ELISA 板上没有 gp130: 空心倒三角。

图 28 图解了在 KB 细胞实验中测量的位点 II OSM 特异性抗体(“hum 15E10”, 人源化 15E10)和位点 III 特异性 OSM 抗体(17H10)之间在 OSM 中和方面的协同性。单独的 17H10 (a)和单独的 hum 15E10 (b)的 OSM 中和: 实心圆; 抗体组合的 OSM 中和: 空心三角。

图 29 图解了人源化 15E10 抗体抑制 RA 滑膜成纤维细胞的 OSM 刺激性 IL-6 分泌的效力。每个符号都表示由不同患者获得的成纤维细胞。

图 30 图解了抗 OSM 抗体 OM4-5.3 对 OSM 结合 gp130 的抑制。OSM (25 ng/ml)与所示浓度的 OM4-5.3 预温育, 然后加入到 ELISA 板中。单独的 OSM: 实心圆; OSM+OM4-5.3: 空心圆。

图 31a 图解了 OM4-41.5 抑制糖基化和非糖基化 OSM 结合 gp130 的效力差异。非糖基化 OSM: 实心圆; 糖基化 OSM: 空心三角。

图 31b 图解了 OM4-5.3.1 抑制糖基化和非糖基化 OSM 结合 gp130 的效力差异。非糖基化 OSM: 实心圆; 糖基化 OSM: 空心三角。

图 32 显示了两种位点 II 特异性 OSM 抗体(a: 15E10, b: 5H2)在 gp130-OSM ELISA 中抗糖基化(实心圆)和非糖基化(空心三角)的活性。

图 33 图解了取自 RA 患者的成对血清和 SF 中的血清和滑液[OSM]之间的关联。

图 34a、34b 和 35 图解了使用实施例的 OSM ELISA 在 OA 滑液中检测的 OSM 浓度。图 34b 表明, 两个样品具有特别高的 OSM 滑液浓度。

图 36 图解了在 12 个月临床实验周期中在 OA 患者血清中存在的 OSM 浓度。#号是患者标识符。

图 37 图示了在 25%人 AB 血清中的典型 OSM 标准曲线。

发明详述

1. 抗体结构

1.1 全抗体

全抗体通常为异源多聚体糖蛋白，含至少两条重链和两条轻链。除 IgM 以外，全抗体是约 150 Kda 的异源四聚体糖蛋白，由两条相同轻(L)链和两条相同重(H)链组成。通常，每条轻链通过一个共价二硫键连接至重链，而不同免疫球蛋白同种型重链之间的二硫键数目有所不同。每条重链和轻链都还具有链内二硫键。每条重链都在一个末端具有可变结构域(V_H)，后接许多恒定区。每条轻链都具有可变结构域(V_L)，恒定区在其另一末端；轻链恒定区与重链的第一个恒定区并列在一起，轻链可变结构域与重链可变结构域并列在一起。基于恒定区的氨基酸序列，可将大部分脊椎动物种抗体的轻链分成称为 κ 和 λ 的两种型中的一种。根据其重链恒定区氨基酸序列，可将人抗体分成 5 个不同的型：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。IgG 和 IgA 可进一步再分为亚型：IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4；以及 IgA1 和 IgA2。存在物种变体，小鼠和大鼠至少具有 IgG2a、IgG2b。抗体的可变结构域赋予抗体结合特异性，某些区表现出特定可变性，称为互补决定区(CDR)。可变区的较保守部分称为构架区(FR)。完整重链和轻链的可变结构域各含有由 3 个 CDR 连接的 4 个 FR。每条链中的 CDR 由 FR 区保持密切接近，并与另一条链的 CDR 一起促使形成抗体的抗原结合位点。恒定区并不直接参与抗体与抗原的结合，但表现出各种效应子功能，例如参与抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、借助于结合 Fc γ 受体的吞噬作用、借助于新生儿 Fc 受体(FcRn)的半寿期/清除率和利用补体级联的 C1q 组分的补体依赖性细胞毒性。

因此，在一个实施方案中，我们提供特异性结合 hOSM 的治疗性全抗体，该抗体调节 hOSM 与 gp130 之间的相互作用。抗体可特

异性结合 hOSM 的位点 II，并抑制或阻断 hOSM 与其在 gp130 上参与 OSM 相互作用的对应残基之间的相互作用。实施例的 ELISA 方法可用于确定任一种特定抗体或其抗原结合片段是否调节 hOSM 与 gp130 之间的相互作用。治疗性全抗体可包含上文所述任一种同种型或其亚型的恒定区(或重链或轻链)。在一个实施方案中，抗体为 IgG 同种型，特别是 IgG1。抗体可为大鼠、小鼠、兔、灵长类动物或人抗体。在一个典型实施方案中，抗体为灵长类动物(例如猕猴、旧世纪猴(Old World monkey)或巨猿(Great Ape)，参见例如 WO99/55369、WO93/02108)或人抗体。

在另一个实施方案中，提供含 SEQ. I.D. NO: 3 或 SEQ. I.D. NO: 42 的 CDRH3 的治疗性全抗体。在另一个实施方案中，提供含具有 SEQ. I.D. NO: 1、2、3、4、5 和 6 的 CDR 的可变区或 SEQ. I.D. NO: 40、41、42、43、44 和 45 的可变区的治疗性全抗体。

在另一个实施方案中，提供含具有 SEQ. I.D. NO: 7 序列的 V_H 结构域和 SEQ. I.D. NO: 8 序列的 V_L 结构域的鼠治疗性全抗体或其抗原结合片段。

在另一个实施方案中，提供含具有 SEQ. I.D. NO: 46 序列的 V_H 结构域和 SEQ. I.D. NO: 47 序列的 V_L 结构域的鼠治疗性全抗体或其抗原结合片段。

1.1.2 人抗体

可利用本领域技术人员已知的多种方法生产人抗体。可通过使用人骨髓瘤或小鼠-人异种骨髓瘤细胞系的杂交瘤方法制备人抗体，参见 Kozbor J. Immunol 133, 3001, (1984)和 Brodeur. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63 页 (Marcel Dekker Inc, 1987)。替代性方法包括使用均采用人 V 区所有组成成分的噬菌体文库或转基因小鼠(参见 Winter G, (1994), Annu. Rev. Immunol 12, 433-455, Green LL (1999), J. Immunol. methods 231, 11-

23)。

目前可利用几个其小鼠免疫球蛋白基因座已被人免疫球蛋白基因区段取代的转基因小鼠品系(参见 Tomizuka K, (2000) PNAS 97, 722-727; Fishwild D. M (1996) Nature Biotechnol. 14, 845-851, Mendez MJ, 1997, Nature Genetics, 15, 146-156)。在抗原攻击时, 这样的小鼠能够生产人抗体谱, 可从中选择目的抗体。

特别值得注意的是人淋巴细胞移植入受辐射小鼠中的 Trimera™ 系统(参见 Eren R 等, (1998) Immunology 93: 154-161)、选择性淋巴细胞抗体系统(SLAM, 参见 Babcook 等, PNAS (1996) 93: 7843-7848)(在该系统中, 人(或其它物种)淋巴细胞有效地实现了大规模组合的体外抗体产生步骤, 继之以去褶皱、有限稀释和选择步骤)和 Xenomouse II™ (Abgenix Inc)。替代方法可由使用 Morphodoma™ 技术的 Morphotek Inc 获得。

噬菌体展示技术可用于生产人抗体(及其片段), 参见 McCafferty; Nature, 348, 552-553 (1990)和 Griffiths AD 等(1994) EMBO 13: 3245-3260。按照该技术, 将抗体 V 结构域基因按读框克隆入丝状噬菌体(例如 M13 或 fd)的主要或次要外壳蛋白基因中, 并作为功能抗体片段展示(通常借助于辅助噬菌体)在噬菌体颗粒表面上。基于抗体功能特性的选择导致选择出具有那些特性的抗体的编码基因。噬菌体展示技术可用于由取自罹患上述疾病或障碍的个体或者取自未免疫人供体的人 B 细胞制备的文库中选择抗原特异性抗体(参见 Marks; J. Mol. Bio. 222, 581-597, 1991)。在需要含 Fc 结构域的人全抗体的情况下, 必须将源自噬菌体展示的片段再克隆入含所需恒定区并建立稳定表达细胞系的哺乳动物表达载体中。

亲和力成熟技术(Marks; Bio/technol 10, 779-783 (1992))可用于提升结合亲和力, 其中通过用天然变体相继取代 H 和 L 链 V 区并以提升的结合亲和性为基础进行选择来提升初级人抗体的亲和力。目前还可利用该技术的变体, 例如“表位印记”, 参见 WO 93/06213。另参

见 Waterhouse; Nucl. Acids Res 21, 2265-2266 (1993)。

因此，在另一个实施方案中，提供特异性结合 hOSM 并调节(即抑制或阻断) hOSM 与 gp130 之间相互作用的人治疗性全抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方案中，提供特异性结合 hOSM 的位点 II 并调节(即抑制或阻断) hOSM 与 gp130 之间相互作用的人治疗性全抗体或其抗原结合片段。

在另一方面，提供含 SEQ. I.D. NO: 3 或 SEQ. I.D. NO: 42 的 CDRH3 的人治疗性全抗体或其抗原结合片段，其特异性结合 hOSM，并调节(即抑制或阻断) hOSM 与 gp130 之间的相互作用。在另一个实施方案中，提供含有具有 SEQ. I.D. NO: 1、2、3、4、5 和 6 的 CDR 的可变区或具有 SEQ. I.D. NO: 40、41、42、43、44 和 45 的可变区的人治疗性全抗体或其抗原结合片段。

1.2 嵌合抗体和人源化抗体

使用非人全抗体治疗人疾病或障碍带有目前已非常确实的潜在免疫原性问题，尤其是在重复给予抗体时，也就是说患者免疫系统可将非人全抗体识别为非自身抗体，并建立中和反应。除了开发全人抗体(参见上文)以外，这些年来还已开发了各种技术，以克服这些问题，这些技术一般包括降低治疗性全抗体中非人氨基酸序列的组成，同时保持由免疫动物(例如小鼠、大鼠或兔)获得非人抗体的相对容易性。概括地说，使用两个途径实现此目标。第一个途径是嵌合抗体，其一般包含融合至人恒定区的非人(例如啮齿动物，例如小鼠)可变结构域。因为抗体的抗原结合位点位于可变区中，所以嵌合抗体保留了其对抗原的结合亲和性，但获得了人恒定区的效应子功能，因此能够执行例如上文所述的效应子功能。嵌合抗体通常使用重组 DNA 法生产。使用常规方法(例如使用能够特异性结合本发明抗体的 H 和 L 链编码基因(例如上文所述 SEQ. I.D. NO: 1、2、3、4、5 和 6 的编码 DNA)的寡核苷酸探针)分离和测定抗体编码 DNA (例如 cDNA)

的序列。杂交瘤细胞用作这样的 DNA 的典型来源。一旦被分离，就把 DNA 置于表达载体中，然后将其转染入在其它情况下不能生产免疫球蛋白的宿主细胞(例如大肠杆菌、COS 细胞、CHO 细胞或骨髓瘤细胞)中，以获得抗体合成。可通过用人 L 和 H 链的编码序列取代对应的非人(例如鼠) H 和 L 恒定区来修饰 DNA，参见例如 Morrison; PNAS 81, 6851 (1984)。

第二个途径包括产生其中通过使可变区人源化来降低抗体非人比例的人源化抗体。两种人源化技术已得到普及。第一个是利用 CDR 嫁接人源化。CDR 构造出接近抗体 N 端的环，在该处它们形成处于由构架区提供的支架上的表面。抗体的抗原结合特异性主要由其 CDR 表面的拓扑结构和化学特征限定。这些特征又由单个 CDR 的构象、CDR 的相对分布和 CDR 构成残基侧链的性质和分布决定。通过将仅非人(例如鼠)抗体(“供体”抗体)的 CDR 嫁接到合适的人构架(“受体”构架)和恒定区上，可实现免疫原性的大幅降低(参见 Jones 等(1986) Nature 321, 522-525 和 Verhoeyen M 等(1988) Science 239, 1534-1536)。但是，CDR 嫁接本身可能不会使抗原结合特性完全保留，经常发现如果要恢复显著的抗原结合亲和性，则供体抗体的某些构架残基必须保留(有时称为“回复突变”)在人源化分子中(参见 Queen C 等(1989) PNAS 86, 10,029-10,033, Co, M 等(1991) Nature 351, 501-502)。在此情况下，可由数据库中选择与非人供体抗体具有最大序列同源性(通常为 60%以上)的人 V 区，以便提供人构架(FR)。可由人共有序列或单个人抗体进行人 FR 选择。在必要时，将供体抗体的关键残基置换入人受体构架中，以保持 CDR 构象。抗体的计算机建模可用于辅助鉴别此种在结构上很重要的残基，参见 WO99/48523。

或者，可通过“镶饰”法实现人源化。对特有的人和鼠免疫球蛋白重链和轻链可变区的统计学分析揭示，暴露残基的确切模式在人和鼠抗体中有差异，大部分各个表面位置对少数不同残基具有强偏向性(参见 Padlan E.A.等; (1991) Mol. Immunol. 28, 489-498 和 Pedersen

J.T.等(1994) *J. Mol. Biol.* 235; 959-973)。因此,有可能通过取代其构架区中与人抗体中通常存在的那些残基不同的暴露残基,降低非人 Fv 的免疫原性。因为蛋白抗原性可能与表面可及性有关联,所以表面残基的置换可能足以使小鼠可变区变成人免疫系统“不可见的”(另参见 Mark G.E.等(1994)载于 *Handbook of Experimental Pharmacology* 113 卷: *The pharmacology of monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, 105-134 页)。该人源化法被称为“镶饰”,因为仅抗体表面被改变,支持残基保持原状。其它替代方法陈述于 WO04/006955。

因此,本发明的另一个实施方案提供嵌合治疗性抗体,其包含融合至人恒定区(其可为 IgG 同种型,例如 IgG1)的非人(例如啮齿动物)可变结构域,其特异性结合 hOSM,并调节 hOSM 的位点 II 与 gp130 之间的相互作用。

在另一个实施方案中,提供含非人(例如啮齿动物)可变区和人恒定区(其可为 IgG 同种型,例如 IgG1)的嵌合治疗性抗体,其特异性结合 hOSM,该抗体进一步包含 SEQ. I.D. NO: 3 或 SEQ. I.D. NO: 42 的 CDRH3。这样的抗体可进一步包含 IgG 同种型(例如 IgG1)的人恒定区。

在另一个实施方案中,提供含非人(例如啮齿动物)可变区和人恒定区(其可为 IgG 同种型,例如 IgG1)的嵌合治疗性抗体,其特异性结合 hOSM,具有 SEQ. I.D. NO: 1、2、3、4、5 和 6 或 SEQ. I.D. NO: 40、41、42、43、44 和 45 的 CDR。

在另一个实施方案中,提供特异性结合 hOSM 并调节(即抑制或阻断) hOSM 的位点 II 与 gp130 之间相互作用的人源化治疗性抗体或其抗原结合片段。

在另一个实施方案中,提供特异性结合 hOSM 并包含 SEQ. I.D. NO: 3 或 SEQ. I.D. NO: 42 的 CDRH3 的人源化治疗性抗体或其抗原结合片段。这样的抗体可包含 IgG 同种型(例如 IgG1)的人恒定区。

在另一个实施方案中,提供特异性结合 hOSM 并包含 SEQ. I.D.

NO: 1、2、3、4、5 和 6 或 SEQ. I.D. NO: 40、41、42、43、44 和 45 的 CDR 的人源化治疗性抗体或其抗原结合片段。这样的抗体可包含 IgG 同种型(例如 IgG1)的人恒定区。

在另一个实施方案中，提供人源化治疗性抗体或其抗原结合片段，其特异性结合 hOSM，调节 hOSM 与 gp130 之间的相互作用，并包含 SEQ. I.D. NO: 11 的重链和 SEQ. I.D. NO: 12 的轻链或基本由其组成。

在另一个实施方案中，提供人源化治疗性抗体或其抗原结合片段，其特异性结合 hOSM，调节 hOSM 与 gp130 之间的相互作用，该抗体包含 SEQ. I.D. NO: 50 的重链和 SEQ. I.D. NO: 51 的轻链或基本由其组成。

在另一个实施方案中，提供人源化治疗性抗体或其抗原结合片段，其特异性结合 hOSM，调节 hOSM 与 gp130 之间的相互作用，其中所述抗体或其片段包含 SEQ. I.D. NO: 3 的 CDRH3，可选地进一步包含 SEQ. I.D. NO: 1、2、4、5 和 6 的 CDR，其中人受体重链构架区 28、29、30、71 和 94 位和人受体轻链构架 49 和 71 位的残基由在 CDRH3 所源自的供体抗体构架中存在的相应残基置换。

在另一个实施方案中，提供人源化治疗性抗体或其抗原结合片段，其特异性结合 hOSM，调节 hOSM 与 gp130 之间的相互作用，其中所述抗体或其片段包含 SEQ. I.D. NO: 42 的 CDRH3，可选地进一步包含 SEQ. I.D. NO: 40、41、43、44、45 的 CDR，其中人受体重链构架区 28、44、48、67、69、71、73 位和人受体轻链构架 36、38、46、47、71 位的残基由在 CDRH3 所源自的供体抗体构架中存在的相应残基置换。

对本领域技术人员显而易见的是，术语“源自”不仅意欲限定材料物理起源意义上的来源，而且用于限定结构上等同于该材料但未发源于所提及来源的材料。因此，“在 CDRH3 所源自的供体抗体中存在的残基”无需一定由供体抗体纯化。

在另一个实施方案中，提供特异性结合 hOSM 的人源化治疗性抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其片段包含 SEQ. I.D. NO: 3 的 CDRH3，可选地进一步包含 SEQ. I.D. NO: 1、2、4、5 和 6 的 CDR，其中人重链构架包含一个或多个(例如全部)以下残基(或其保守置换物):

位置	残基
28	S
29	L
30	T
71	K
94	K

人轻链包含以下残基(或其保守置换物)中的任一个或两个:

位置	残基
49	E
71	Y

在另一个实施方案中，提供特异性结合 hOSM 的人源化治疗性抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其片段包含 SEQ. I.D. NO: 1、2、3、4、5 和 6 的 CDR，其中人重链构架包含一个或多个(例如全部)以下残基(或其保守置换物):

位置	残基
28	S
29	L
30	T
71	K
94	K

人轻链包含以下残基(或其保守置换物)中的任一个或两个:

位置	残基
49	E
71	Y

在另一个实施方案中，提供特异性结合 hOSM 的人源化治疗性

抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段包含 SEQ. I.D. NO: 42 的 CDRH3, 可选地进一步包含 SEQ. I.D. NO: 40、41、43、44、45 的 CDR, 其中人重链构架包含一个或多个(例如全部)以下残基(或其保守置换物):

位置	残基
28	I
48	I
44	K
67	A
69	L
71	V
73	K

人轻链包含一个或多个(例如全部)以下残基(或其保守置换物):

位置	残基
36	F
38	K
46	R
47	W
71	Y

在另一个实施方案中, 提供特异性结合 hOSM 的人源化治疗性抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其片段包含 SEQ. I.D. NO: 40、41、43、44、45 的 CDR, 其中人重链构架包含一个或多个(例如全部)以下残基(或其保守置换物):

位置	残基
28	I
48	I
44	K
67	A
69	L
71	V

73 K

人轻链包含一个或多个(例如全部)以下残基(或其保守置换物):

位置	残基
36	F
38	K
46	R
47	W
71	Y

本领域公认可把某些氨基酸取代看作“保守的”。基于共有的侧链特性，将氨基酸分为多个类别，这些类别中保持本发明抗体或其抗原结合片段的全部或基本全部结合亲和性的置换被看作是保守置换，参见下表：

侧链	成员
疏水性	met、ala、val、leu、ile
中性亲水	cys、ser、thr
酸性	asp、glu
碱性	asn、gln、his、lys、arg
影响链方向的残基	gly、pro
芳香族	trp、tyr、phe

1.3 双特异性抗体

双特异性抗体是对至少两个不同表位具有结合特异性的抗体。制备这样的抗体的方法是本领域已知的。传统上，双特异性抗体的重组生产是基于两个免疫球蛋白 H 链-L 链对的共表达，其中两个 H 链具有不同的结合特异性，参见 Millstein 等，Nature 305 537-539 (1983)、WO93/08829 和 Traunecker 等 EMBO, 10, 1991, 3655-3659。因为 H 和 L 链的随机分配，所以产生 10 种不同抗体结构的潜在混合物，其中仅有 1 种具有所需结合特异性。替代性方法包括将具有所需结合特异性的可变结构域融合至含至少部分铰链区、CH2 和 CH3

区的重链恒定区。优选具有含在至少一种融合蛋白中存在的轻链结合所必需的位点的 CH1 区。将编码这些融合蛋白的 DNA 和(如果需要的话) L 链插入到分开的表达载体中, 然后共转染入合适的宿主生物中。但是, 将两条或全部三条链的编码序列插入到一个表达载体中是有可能的。在一个优选方法中, 双特异性抗体由在一条臂中具有第一种结合特异性的 H 链和在另一条臂中提供第二结合特异性的 H-L 链对组成, 参见 WO94/04690。另参见 Suresh 等 *Methods in Enzymology* 121, 210, 1986。

在本发明的一个实施方案中, 提供双特异性治疗性抗体, 其中所述抗体的至少一种结合特异性针对 hOSM, 其中所述抗体调节(即抑制或阻断) hOSM 的位点 II 与 gp130 之间的相互作用。这样的抗体可进一步包含人 IgG 同种型(例如 IgG1)的恒定区。

在本发明的一个实施方案中, 提供双特异性治疗性抗体, 其中所述抗体的至少一种结合特异性针对 hOSM, 其中所述抗体包含 SEQ. I.D. NO: 3 或 SEQ. I.D. NO: 42 中的至少一个 CDRH3。这样的抗体可进一步包含人 IgG 同种型(例如 IgG1)的恒定区。

在本发明的一个实施方案中, 提供双特异性治疗性抗体, 其中所述抗体的至少一种结合特异性针对 hOSM, 其中所述抗体包含至少 SEQ. I.D. NO: 1、2、3、4、5 和 6 或 SEQ. I.D. NO: 40、41、42、43、44 和 45 的 CDR。这样的抗体可进一步包含人 IgG 同种型(例如 IgG1)的恒定区。

1.4 抗体片段

在本发明的某些实施方案中, 提供调节 OSM (特别是 hOSM)与 gp130 之间相互作用的治疗性抗体片段。这样的片段可为全抗体和/或人源化和/或嵌合抗体的功能性抗原结合片段, 例如上文所述抗体的 Fab、Fd、Fab'、F(ab')₂、Fv、ScFv 片段。传统上, 这样的片段通过例如木瓜蛋白酶消化蛋白水解而消化全抗体来生产(参见例如 WO

94/29348), 但可直接由重组转化的宿主细胞生产。关于 ScFv 的生产, 参见 Bird 等; (1988) *Science*, 242, 423-426。另外, 可使用各种如下文所述的工程技术生产抗体片段。

Fv 片段两条链的相互作用能量似乎低于 Fab 片段。为稳定 V_H 和 V_L 结构域的结合, 用肽(Bird 等, (1988) *Science* 242, 423-426, Huston 等, *PNAS*, 85, 5879-5883)、二硫桥(Glockshuber 等, (1990) *Biochemistry*, 29, 1362-1367)和“杵臼结构(knob in hole)”突变(Zhu 等(1997), *Protein Sci.*, 6, 781-788)连接它们。ScFv 片段可通过本领域技术人员众所周知的方法生产, 参见 Whitlow 等(1991) *Methods companion Methods Enzymol*, 2, 97-105 和 Huston 等(1993) *Int. Rev. Immunol* 10, 195-217。ScFv 可在细菌细胞(例如大肠杆菌)中生产, 但更通常在真核细胞中生产。ScFv 的一个缺点是产物的单价性及其短半寿期, 产物的单价性排除了由于多价结合而产生的亲和力增加。为克服这些问题的尝试包括通过化学偶联(Adams 等(1993) *Can. Res* 53, 4026-4034 和 McCartney 等(1995) *Protein Eng.* 8, 301-314)由含另外的 C 端半胱氨酸的 ScFv 生产二价($ScFv'$)₂, 或通过含不成对 C 端半胱氨酸残基的 ScFv 的自发位点特异性二聚化(参见 Kipriyanov 等(1995) *Cell. Biophys* 26, 187-204)生产二价($ScFv'$)₂。或者, 可通过将肽接头缩短至 3-12 个残基以形成“双抗体(diabodies)”, 迫使 ScFv 形成多聚体, 参见 Holliger 等, *PNAS* (1993), 90, 6444-6448。缩小接头可更进一步地产生 ScFv 三聚体(“三抗体(triabodies)”)参见 Kortt 等(1997) *Protein Eng.* 10, 423-433)和四聚体(“四抗体(tetrabodies)”)参见 Le Gall 等(1999) *FEBS Lett*, 453, 164-168)。还可通过与蛋白二聚化基序基因融合以形成“小抗体(miniantibodies)”(参见 Pack 等(1992) *Biochemistry* 31, 1579-1584)和“微型抗体(minibodies)”(参见 Hu 等(1996), *Cancer Res.* 56, 3055-3061), 实现二价 ScFv 分子的构建。还可通过利用第三个肽接头连接两个 ScFv 单元, 生产 ScFv-Sc-Fv 串联体(tandem) (($ScFv$)₂), 参见 Kurucz 等(1995) *J. Immunol.* 154, 4576-4582。可通过非共价结合两个单链融和

蛋白产物(由利用短接头将一种抗体的 V_H 结构域与另一种抗体的 V_L 结构域连接而构成)生产双特异性双抗体,参见 Kipriyanov 等(1998), *Int. J. Can* 77, 763-772。可通过导入二硫桥或如上所述的“杵臼结构”突变或通过形成其中两个杂种 ScFv 片段经肽接头连接的单链双抗体(ScDb)增强这样的双特异性双抗体的稳定性,参见 Kontermann 等(1999) *J. Immunol. Methods* 226 179-188。通过例如经铰链区将 ScFv 片段融合至 IgG 分子的 CH3 结构域或 Fab 片段,可获得四价双特异性分子,参见 Coloma 等(1997) *Nature Biotechnol.* 15, 159-163。或者,通过融合双特异性单链双抗体创建四价双特异性分子(参见 Alt 等, (1999) *FEBS Lett* 454, 90-94)。还可通过用含螺旋-环-螺旋基序的接头使 ScFv-ScFv 串联体二聚化(DiBi 小分子抗体,参见 Muller 等(1998) *FEBS Lett* 432, 45-49)或以防止分子间配对的方向使含 4 个抗体可变结构域 (V_H 和 V_L) 的单链分子二聚化(串联双抗体,参见 Kipriyanov 等, (1999) *J. Mol. Biol.* 293, 41-56), 形成较小的四价双特异性分子。可通过化学偶联 Fab' 片段或通过亮氨酸拉链杂二聚化创建双特异性 $F(ab')_2$ 片段(参见 Shalaby 等, (1992) *J. Exp. Med.* 175, 217-225 和 Kostelny 等(1992), *J. Immunol.* 148, 1547-1553)。还可利用分离的 V_H 和 V_L 结构域 (Domantis plc), 参见 US 6,248,516、US 6,291,158、US 6,172,197。

在一个实施方案中,提供特异性结合 hOSM 并调节(即抑制或阻断) hOSM 的位点 II 与 gp130 之间相互作用的治疗性抗体片段(例如上文所述的 ScFv、Fab、Fd、Fab'、 $F(ab')_2$ 或工程抗体片段)。治疗性抗体片段可包含具有 SEQ. I.D. NO: 3 序列的 CDRH3, 可选地还有具有 SEQ. I.D. NO: 1、2、4、5 和 6 所列序列的 CDR, 或者治疗性抗体片段可包含具有 SEQ. I.D. NO: 42 的 CDRH3, 可选地还有具有 SEQ. I.D. NO: 40、41、43、44 和 45 所列序列的 CDR。

1.5 杂缀合抗体(Heteroconjugate antibody)

杂缀合抗体也构成本发明的实施方案。杂缀合抗体由两个共价

连接的抗体组成，使用任一种便利的交联方法形成。参见 US 4,676,980。

1.6 其它修饰

一般认为，抗体的 Fc 区和各种 Fc 受体(FcγR)之间的相互作用介导抗体的效应子功能，包括抗体依赖性细胞的细胞毒活性(ADCC)、补体结合、吞噬作用和抗体的半寿期/清除。可根据所需效应子特性对本发明抗体的 Fc 区进行各种修饰。例如，Fc 区中的特定突变使在其它情况下为裂解性的抗体变成非裂解性的，这样的突变详述于 EP 0629 240B1 和 EP 0307434B2，或者人们可将补救受体结合表位加入到抗体中，以增加血清半寿期，参见 US 5,739,277。目前有 5 个公认的人 Fcγ受体：FcγR(I)、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa 和新生儿 FcRn。Shields 等, (2001) J. Biol. Chem 276, 6591-6604 表明，通用的一组 IgG1 残基参与结合所有的 FcγR，而 FcγRII 和 FcγRIII 利用该通用组以外的不同位点。当一组 IgG1 残基：Pro-238、Asp-265、Asp-270、Asn-297 和 Pro-239 改变成丙氨酸时，其降低对所有 FcγR 的结合。全部残基都位于 IgG CH2 结构域中，并聚簇在连接 CH1 和 CH2 的铰链区附近。FcγRI 仅利用通用组 IgG1 残基结合，而除了通用组以外，FcγRII 和 FcγRIII 还与不同的残基相互作用。某些残基的改变仅降低与 FcγRII (例如 Arg-292)或 FcγRIII (例如 Glu-293)的结合。某些变体显示与 FcγRII 或 FcγRIII 的结合提升，但不影响与另一受体的结合(例如 Ser-267Ala 提升与 FcγRII 的结合，但与 FcγRIII 的结合不受影响)。其它变体表现出与 FcγRII 或 FcγRIII 的结合提升，与另一受体的结合降低(例如 Ser-298Ala 提升与 FcγRIII 的结合而降低与 FcγRII 的结合)。对于 FcγRIIIa，最佳结合性 IgG1 变体在 Ser-298、Glu-333 和 Lys-334 具有组合的丙氨酸置换。一般认为新生儿 FcRn 受体既涉及抗体清除，又涉及穿越组织的胞转作用(参见 Junghans R.P (1997) Immunol. Res 16. 29-57 和 Ghetie 等(2000) Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766)。被确

定与人 FcRn 直接相互作用的人 IgG1 残基包括 Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434 和 His435。本发明因此涉及具有任一种(或多种)以上详述的残基变化的本发明抗体,以改善半寿期/清除和/或效应子功能,例如 ADCC 和/或补体裂解。在本发明的再一方面,提供人源化治疗性抗体,其特异性结合 hOSM,并调节 hOSM 与 gp130 之间的相互作用且在 235 位(例如 L235A)和 237 位(例如 G237A)具有丙氨酸(或其它干扰)置换。在本发明进一步的实施方案中,提供人源化治疗性抗体,其特异性结合 hOSM,并包含 SEQ. I.D. NO: 61 的重链和 SEQ. I.D. NO: 12 的轻链。

其它修饰包括本发明抗体的糖基化变体。已知在抗体恒定区中的保守位置使抗体糖基化对抗体功能(特别是例如上文所述的那些效应子功能)具有深远影响,参见例如 Boyd 等(1996), *Mol. Immunol.* 32, 1311-1318。设想了其中加入、置换、缺失或修饰一个或多个糖部分的本发明治疗性抗体或其抗原结合片段的糖基化变体。引入天冬酰胺-X-丝氨酸或天冬酰胺-X-苏氨酸基序创建了供酶连接糖部分用的潜在位点,并因此可用于操作抗体的糖基化。在 Raju 等(2001) *Biochemistry* 40, 8868-8876 中,通过使用 β -1,4-半乳糖基转移酶和/或 α ,2,3 唾液酸转移酶的再糖基化和/或再唾液酸化法,增加了 TNFR-IgG 免疫粘附素的末端唾液酸化。一般认为,增加末端唾液酸化增加免疫球蛋白的半寿期。和大部分糖蛋白一样,抗体实际上通常作为糖型混合物产生。当抗体在真核细胞(特别是哺乳动物细胞)中产生时,该混合物特别明显。已开发了各种方法来生产限定的糖型,参见 Zhang 等 *Science* (2004), 303, 371, Sears 等, *Science*, (2001) 291, 2344, Wacker 等(2002) *Science*, 298 1790, Davis 等(2002) *Chem. Rev.* 102, 579, Hang 等(2001) *Acc. Chem. Res* 34, 727。因此,本发明涉及多种如本文所述的治疗性(通常为单克隆)抗体(其可为 IgG 同种型,例如 IgG1),其包含所述抗体或其抗原结合片段的限定数目(例如 7 种以下,例如 5 种以下,如 2 种或 1 种)的糖型。

本发明的其它实施方案包括本发明的治疗性抗体或其抗原结合片段，其偶联至非蛋白质聚合物，例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯。蛋白与 PEG 缀合是一种已确立的用于增加蛋白半寿期以及降低蛋白抗原性和免疫原性的技术。业已用全抗体以及 Fab' 片段研究了采用不同分子量和类型(线性或分支) PEG 化的应用，参见 Koumenis I.L.等(2000) *Int. J. Pharmaceut.* 198: 83-95。

血脑屏障(BBB)的存在妨碍了治疗性蛋白传递入脑中。在需要穿过 BBB 传递本发明的抗体或本发明的抗体片段的情况下，已提出了各种策略来增强在需要情况下的这种传递。

为了由血液获得所需营养物和因子，BBB 具有某些特异性受体，其将化合物由循环血转运至脑。研究已表明，某些化合物，如胰岛素(参见 Duffy KR 等(1989) *Brain Res.* 420: 32-38)、转铁蛋白(参见 Fishman JB 等(1987) *J. Neurosci* 18: 299-304)和胰岛素样生长因子 1 和 2 (参见 Pardridge WM (1986) *Endocrine Rev.* 7: 314-330 和 Duffy KR 等(1986) *Metabolism* 37: 136-140)，经受体介导的胞转作用穿过 BBB。因此，这些分子的受体提供了一种潜在方法：使用所谓的“载体化”抗体使本发明抗体和/或本发明抗体片段进入脑(参见 Pardridge WM (1999) *Advanced Drug Delivery Review* 36: 299-321)。例如，业已表明，转铁蛋白受体的抗体被动态转运入脑实质中(参见 Friden PM 等(1991) *PNAS* 88: 4771-4775 和 Friden PM 等(1993) *Science* 259: 373-377)。因此，一个潜在方法是生产例如上文所述的双特异性抗体或双特异性片段，其中第一种特异性针对 hOSM 的位点 II (例如第一种特异性包含 SEQ. I.D. NO: 3 的 CDRH3，可选地还有 SEQ. I.D. NO: 1、2、4、5 和 6 的 CDR，或包含 SEQ. I.D. NO: 42 的 CDRH3，可选地还有 SEQ. I.D. NO: 40、41、43、44、45 的 CDR)，而第二种特异性针对位于 BBB 中的转运受体，例如第二种特异性针对转铁蛋白转运受体。

2. 竞争性免疫球蛋白

本发明还提供免疫球蛋白、抗体和抗体的抗原结合片段，以及其它蛋白实体，例如免疫粘附素，它们特异性结合 hOSM，并竞争性抑制 hOSM 与含 SEQ. I.D. NO: 11 的重链和 SEQ. I.D. NO: 12 的轻链的本发明治疗性抗体或其抗原结合片段之间的结合。竞争性免疫球蛋白、抗体和抗体的抗原结合片段以及其它蛋白实体(例如免疫粘附素)在等摩尔浓度下表现出至少 25% 的抑制，通常 35% 或更高的抑制，更通常至少 50% 的抑制。

因此，在本发明的一个实施方案中，提供筛选候选抗体或抗体片段以确定候选抗体或抗体片段是否为本文所述的竞争性抗体的方法，该方法包括以下步骤：

(a) 温育候选抗体或抗体片段与含 SEQ. I.D. NO: 11 的重链和 SEQ. I.D. NO: 12 的轻链的治疗性抗体或其抗原结合片段；

(b) 确定步骤(a)的候选抗体或其抗体片段是否竞争性抑制该治疗性抗体或其抗原结合片段与 OSM 之间的结合(特别是与 hOSM 之间的结合)。通常使用 ELISA 型实验，例如在实施例中陈述的 ELISA。通常，OSM 和/或 hOSM 被糖基化。通常，OSM 和/或 hOSM 已由哺乳动物细胞糖基化，哺乳动物细胞例如为重组转化的 CHO、NS0 细胞或人细胞。在其它实施方案中，OSM 和 hOSM 已由其来源的天然细胞糖基化，即 hOSM 已由人细胞糖基化(例如 hOSM 可分离自人抗体)。

因此，还提供竞争性治疗性抗体或其抗原结合片段，其竞争性抑制包含具有 SEQ. I.D. NO: 1、2、3、4、5 和 6 所列序列的 CDR 的治疗性抗体或其抗原结合片段的结合。

还提供竞争性治疗性抗体或其抗原结合片段，其竞争性抑制包含 SEQ. I.D. NO: 11 的重链和 SEQ. I.D. NO: 12 的轻链的治疗性抗体或其抗原结合片段的结合。

竞争性治疗性抗体或其抗原结合片段可具有上述抗体结构中的

任一种。例如，竞争性治疗性抗体可为灵长类动物或人全抗体或人源化抗体，通常为 IgG 同种型，例如 IgG1 或 IgG4。竞争性治疗性抗体片段可为 Fab、Fab'、Fd、F(ab')₂、ScFv 等。竞争性治疗性抗体可按照本说明书公开的方法生产。

用于上文所述筛选方法的典型方案陈述于以下的实施例。

10D3 是本发明竞争性抗体的一个实例。参见下文的表 A。

2.1 其它筛选方法

本发明的再一方面部分基于以下发现：hOSM 的糖基化在抗 hOSM 抗体和 hOSM 之间的结合事件中起意想不到的作用。本发明因此扩展至筛选特异性结合 hOSM 的抗体的方法，该方法包括在允许结合的条件下温育所述抗体和糖基化 OSM (特别是 hOSM)，并检测抗体的结合亲和性。下文详述的 ELISA 法使这样的方法成为可能。可以具有高于 1 μ M (通常高于 100 nM, 更通常高于 1 nM, 例如 100 pM 以上)的结合亲和性(Kd)为基准选择抗体(其可以具有以上详述的任一种结构)。

可进一步以其结合非糖基化 OSM (例如 hOSM)的能力为基准选择抗体。因此，通常以其能够结合糖基化 OSM (例如 hOSM)并进一步还能以相同或相似的程度(例如以 Biacore™实验检测，具有相同或相似的结合亲和力)结合非糖基化 OSM (例如 hOSM)为基准选择抗体。

按照本文方法选择的抗体可进一步工程化(例如，必要时，通过例如操作抗体编码多核苷酸而人源化)，并加入到药用组合物中。通过本文方法选择的抗体和编码此抗体的多核苷酸构成本发明的实施方案。因此，本发明提供筛选推定结合 OSM (特别是 hOSM)的抗体(例如针对 OSM/hOSM 产生的抗体)的方法，该方法包括：

(a)在允许结合的条件下温育所述抗体和糖基化 OSM (特别是糖基化 hOSM)；

(b)检测所述抗体的结合亲和力;

(c)如果所述抗体具有的结合亲和力高于 $1 \mu\text{M}$, 通常高于 100 nM , 则选择所述抗体;

(d)提供步骤(c)的所述抗体的编码多核苷酸, 并用含所述多核苷酸的载体转化或转染哺乳动物宿主细胞;

(e)在允许所述抗体分泌入培养基中的条件下培养步骤(d)的所述宿主细胞;

(f)可选地纯化步骤(e)的培养基;

(g)将步骤(e)或(f)的抗体加入到药用组合物中。

还提供了由该方法鉴别的抗体在下文详述的疾病或障碍的治疗药物生产中的用途。

还提供特异性结合天然糖基化 hOSM (特别是结合天然糖基化 hOSM 的位点 II)并调节所述天然糖基化 hOSM 与 gp130 之间相互作用的抗体(例如全抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体)在下文详述的疾病或障碍的治疗药物生产中的用途。进一步提供在相同实验条件下以对非糖基化 hOSM 相同或相似的结合亲和力特异性结合天然糖基化 hOSM 的抗体。本发明的一个实施方案是特异性结合糖基化 hOSM 的抗体, 特别是结合天然糖基化 hOSM 的那些抗体。抗体 15E10 是特异性结合糖基化 hOSM 的抗体的实例。

在某些实施方案中, 该方法使用由哺乳动物细胞(例如 CHO 或 NS0)糖基化的 hOSM。在其它实施方案中, 该方法使用已由人细胞(例如重组转化或转染的人宿主细胞)糖基化的 hOSM 或已由人体中分离出的天然 hOSM (例如由存在于关节炎(例如 RA)人患者滑液中的细胞制备的 hOSM)。

3. 生产方法

本发明的抗体可作为多克隆群生产, 但更通常作为单克隆群(即作为抗特异性抗原结合位点的相同抗体的基本均一群)生产。本发明

的抗体可在转基因生物中生产，例如山羊(参见 Pollock 等(1999), *J. Immunol. Methods* 231: 147-157)、鸡(参见 Morrow KJJ (2000) *Genet. Eng. News* 20: 1-55)、小鼠(参见 Pollock 等, 出处同上)或植物(参见 Doran PM, (2000) *Curr. Opinion Biotechnol.* 11, 199-204, Ma JK-C (1998), *Nat. Med.* 4; 601-606, Baez J 等, *BioPharm* (2000) 13: 50-54, Stoger E 等; (2000) *Plant Mol. Biol.* 42: 583-590)。还可通过化学合成生产抗体。但是，通常使用本领域技术人员众所周知的重组细胞培养技术生产本发明的抗体。分离编码抗体的多核苷酸，并将其插入到可复制载体(例如质粒)中，用于进一步克隆(扩增)或表达。一个有用的表达系统是谷氨酸合成酶系统(例如 Lonza Biologics 所售卖的系统)，特别是在宿主细胞为 CHO 或 NS0 时(参见下文)。使用常规方法(例如寡核苷酸探针)易于分离和测序编码抗体的多核苷酸。可使用的载体包括质粒、病毒、噬菌体、转位子、微小染色体，其中质粒为典型实施方案。一般来说，这样的载体进一步包括有效连接至轻链和/或重链多核苷酸的信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列，以利于表达。可将编码轻链和重链的多核苷酸插入到分开的载体中，并导入(例如通过电穿孔)到同一宿主细胞中，或者如果有需要的话，可将重链和轻链同时插入到同一载体中，用于转染入宿主细胞中。因此，按照本发明的一个实施方案，提供构建编码本发明的治疗性抗体或其抗原结合片段的轻链和/或重链的载体的方法，该方法包括将编码本发明治疗性抗体的轻链和/或重链的多核苷酸插入到载体中。参见下表 A。

在本发明的另一实施方案中，提供编码具有 SEQ. I.D. NO: 15 或 SEQ. I.D. NO: 52 所列序列的鼠 V_H 结构域的多核苷酸。

在本发明的另一个实施方案中，提供编码具有 SEQ. I.D. NO: 16 或 SEQ. I.D. NO: 53 所列序列的鼠 V_L 结构域的多核苷酸。

在本发明的另一个实施方案中，提供编码具有 SEQ. I.D. NO: 17 或 SEQ. I.D. NO: 54 所列序列的人源化 V_H 结构域的多核苷酸。

在本发明的另一个实施方案中，提供编码具有 SEQ. I.D. NO: 18 或 SEQ. I.D. NO: 55 所列序列的人源化 V_L 链的多核苷酸。

在本发明的另一个实施方案中，提供编码具有 SEQ. I.D. NO: 19 或 SEQ. I.D. NO: 56 所列序列的人源化重链的多核苷酸。

在本发明的另一个实施方案中，提供编码具有 SEQ. I.D. NO: 20 或 SEQ. I.D. NO: 57 所列序列的人源化轻链的多核苷酸。

本领域技术人员即时就会明白，由于遗传密码的冗余性，还可获得编码本发明多肽的本文公开多核苷酸的替代多核苷酸。

3.1 信号序列

本发明的抗体可作为具有异源信号序列的融合蛋白生产，该异源信号序列在成熟蛋白的 N 端具有特异性切割位点。宿主细胞应识别并加工该信号序列。对于原核宿主细胞，信号序列可为碱性磷酸酶、青霉素酶或热稳定肠毒素 II 前导序列。对于酵母分泌，信号序列可为酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列或酸性磷酸酶前导序列，参见例如 WO90/13646。在哺乳动物细胞系统中，可利用病毒分泌前导序列(例如单纯疱疹 gD 信号)和天然免疫球蛋白信号序列(例如人 Ig 重链)。通常信号序列按读框与本发明抗体的编码 DNA 连接。

3.2 复制起点

复制起点在本领域众所周知，pBR322 适于大多数革兰氏阴性细菌，2 μ 质粒适于大多数酵母，各种病毒起点，例如 SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV，适于大多数哺乳动物细胞。一般来说，哺乳动物表达载体不需要复制起点元件，但可使用 SV40，因为其包含早期启动子。

3.3 选择标记

典型的选择基因所编码的蛋白(a)赋予对抗生素或其它毒素(例如

氨苄青霉素、新霉素、氨甲喋呤或四环素)的抗性或(b)补充营养缺陷或提供复合培养基中不可获得的营养物。选择方案可包括使宿主细胞的生长停滞。由于例如选择标记赋予的药物抗性,所以已用本发明的治疗性抗体编码基因成功转化的细胞存活。另一个实例是所谓的 DHFR 选择标记,其中转化子在氨甲喋呤存在下培养。CHO 细胞是用于 DHFR 选择的特别有用的细胞系。使用 DHFR 系统扩增和选择宿主细胞的方法在本领域沿用已久,参见 Kaufman R.J.等 J. Mol. Biol. (1982) 159, 601-621, 关于综述,参见 Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M, "Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals", *Arzneimittel-Forschung*. 48 (8): 870-80, 1998 Aug. 另一个实例是谷氨酸合成酶表达系统(Lonza Biologics)。适用于酵母的选择基因是 *trp1* 基因;参见 Stinchcomb 等 *Nature* 282, 38, 1979。

3.4 启动子

将适于表达本发明抗体的启动子有效连接至编码抗体的 DNA/多核苷酸。原核宿主启动子包括 *phoA* 启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸和杂种启动子,例如 *Tac*。适于在酵母细胞中表达的启动子包括 3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶,例如烯醇酶、甘油醛 3 磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖 6 磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶和葡糖激酶。诱导型酵母启动子包括乙醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、金属硫蛋白和负责氮代谢或麦芽糖/半乳糖利用的酶。

用于在哺乳动物细胞系统中表达的启动子包括病毒启动子,例如多瘤病毒、禽痘病毒和腺病毒(例如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒(特别是立即早期基因启动子)、逆转录病毒、乙型肝炎病毒、肌动蛋白、Rous 肉瘤病毒(RSV)启动子以及猿猴病毒 40 早期或晚期启动子。当然,启动子的选择是基于与用于表达的宿

主细胞的合适相容性。

3.5 增强子元件

合适时，例如当适于在高等真核生物中表达时，可使用在载体中有效连接至启动子元件的增强子元件。合适的哺乳动物增强子序列包括珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、胎蛋白和胰岛素的增强子元件。或者，人们可使用真核细胞病毒的增强子元件，例如 SV40 增强子(位于 bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒增强子、杆状病毒增强子或鼠 IgG2a 基因座(参见 WO04/009823)。增强子通常位于载体上启动子上游的位点处。

3.6 宿主细胞

对编码本发明抗体的克隆或表达载体而言，合适的宿主细胞为原核细胞、酵母细胞或高等真核细胞。合适的原核细胞包括真细菌，例如肠杆菌科，如埃希氏菌属(*Escherichia*)(例如大肠杆菌(例如 ATCC 31,446、31,537、27,325))、肠杆菌属(*Enterobacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、变形菌属(*Proteus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)(例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌属(*Serratia*)(例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*))和志贺氏菌属(*Shigella*)以及芽孢杆菌属(例如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*))(参见 DD 266 710)、假单胞菌属(例如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*))和链霉菌属(*Streptomyces*)。在酵母宿主细胞中，还设想了酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)(例如 ATCC 16,045、12,424、24178、56,500)、*yarrowia* (EP402,226)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia Pastors*)(EP183,070,另参见 Peng 等 J. Biotechnol. 108 (2004) 185-192)、念珠菌属(*Candida*)、里氏木霉(*Trichoderma reesia*)(EP244,234)、青霉属(*Penicillin*)、*Tolyocladium* 和曲霉属

(*Aspergillus*)宿主, 例如构巢曲霉(*A. nidulans*)和黑曲霉(*A. niger*)。

尽管本发明具体设想了原核和酵母宿主细胞, 但通常本发明的宿主细胞为脊椎动物细胞。合适的脊椎动物宿主细胞包括哺乳动物细胞, 例如 COS-1 (ATCC No. CRL 1650)、COS-7 (ATCC CRL 1651)、人胚胎肾细胞系 293、幼仓鼠肾细胞(BHK)(ATCC CRL. 1632)、BHK570 (ATCC NO: CRL 10314)、293 (ATCC NO. CRL 1573)、中国仓鼠卵巢细胞 CHO (例如 CHO-K1, ATCC NO: CCL 61、DHFR-CHO 细胞系(例如 DG44)(参见 Urlaub 等, (1986) Somatic Cell Mol. Genet. 12, 555-556)), 特别是那些适于悬浮培养的 CHO 细胞系)、小鼠支持细胞、猴肾细胞、非洲绿猴肾细胞(ATCC CRL-1587)、HELA 细胞、犬肾细胞(ATCC CCL 34)、人肺细胞(ATCC CCL 75)、Hep G2 和骨髓瘤或淋巴瘤细胞, 例如 NS0 (参见 US 5,807,715)、Sp2/0、Y0。

因此, 在本发明的一个实施方案中, 提供稳定转化的宿主细胞, 其包含编码如本文所述的治疗性抗体或其抗原结合片段的重链和/或轻链的载体。通常, 这样的宿主细胞包含编码轻链的第一载体和编码所述重链的第二载体。

细菌发酵

细菌系统特别适合于表达抗体片段。这样的片段位于胞内或周质中。不溶性周质蛋白可按照本领域技术人员已知的方法被提取和重折叠, 以形成活性蛋白, 参见 Sanchez 等(1999) J. Biotechnol. 72, 13-20 和 Cupit PM 等(1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277。

3.7 细胞培养方法

可通过本领域技术人员已知的任意方法, 培养用编码本发明的治疗性抗体或其抗原结合片段的载体转化的宿主细胞。宿主细胞可在纺锤型烧瓶、转瓶或中空纤维系统中培养, 但对于大规模生产而言, 优选使用搅拌釜反应器, 特别是对于悬浮培养而言。通常, 搅

拌釜适合于使用例如分布器、挡板或低剪切叶轮通气。对于鼓泡塔和气升式反应器，可使用空气或氧气泡直接通气。当在无血清培养基中培养宿主细胞时，优选培养基补充细胞保护剂(例如 Pluronic F-68)，以帮助防止由于通气过程而产生的细胞损伤。根据宿主细胞特征，或者可使用微载体作为贴壁依赖性细胞系的生长基质，或者细胞可适于悬浮培养(这是代表性的)。宿主细胞(特别是脊椎动物宿主细胞)的培养可利用各种操作模式，例如分批补料、重复分批加工(参见 Drapeau 等(1994) *cytotechnology* 15: 103-109)、持续分批加工(extended batch processing)或灌注培养。尽管重组转化的哺乳动物宿主细胞可在含血清的培养基(例如含胎牛血清(FCS)的培养基)中生长，但优选这样的宿主细胞在合成的无血清培养基(例如公开于 Keen 等(1995) *Cytotechnology* 17: 153-163 的培养基)或可商购的培养基(例如 ProCHO-CDM 或 UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA))中培养，在需要时可补加能源，例如葡萄糖和合成生长因子，例如重组胰岛素。宿主细胞的无血清培养可能要求那些宿主细胞适于在无血清条件下生长。一个适应方法是在含血清的培养基中培养此宿主细胞，并反复地将 80%的培养基更换为无血清培养基，以使宿主细胞习得适应无血清条件(参见例如 Scharfenberg K 等(1995) 载于 *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E.C.等编辑), 619-623 页, Kluwer Academic publishers)。

可使用各种技术由培养基回收和纯化分泌入培养基中的本发明抗体，以提供适于预定用途的纯化度。例如，和含治疗性抗体的培养基相比，用于治疗人患者的本发明治疗性抗体通常要求至少 95% 纯度，更通常 98%或 99%纯度。首先，通常使用离心，接着使用例如微滤、超滤和/或深层过滤的上清液澄清步骤，由培养基中去除细胞碎片。可利用各种其它技术(例如透析和凝胶电泳)以及层析技术，例如羟磷灰石(HA)、亲和层析(可选地包含亲和标签系统，例如聚组氨酸)和/或疏水作用层析(HIC, 参见 US 5,429,746)。在一个实施方案

中，在各种澄清步骤后，使用 A 蛋白或 G 蛋白亲和层析，接着进一步使用层析步骤，例如离子交换和或 HA 层析、阴离子或阳离子交换、大小排阻层析和磷酸铵沉淀，捕获本发明抗体。通常，还使用各种病毒去除步骤(例如使用例如 DV-20 滤器的纳米过滤)。在这些不同步骤之后，提供含至少 75 mg/ml 以上(例如 100 mg/ml 以上)本发明抗体或其抗原结合片段的纯化(通常为单克隆)制品，因此构成本发明的实施方案。相称地，此制品基本无聚集形式的本发明抗体。

4. 药用组合物

可将如上所述的本发明抗体的纯化制品(特别是单克隆制品)加入到药用组合物中，用于治疗例如上文概述的人疾病和障碍。通常，此组合物进一步包含合格药学从业人员已知和要求的药学可接受的(即惰性)载体，参见例如 Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16 版, (1980), Mack Publishing Co。此载体的实例包括灭菌载体，例如用合适的缓冲剂缓冲至 pH 5-8 的盐水、Ringers 溶液或葡萄糖溶液。适宜地，用于注射(例如通过静脉、腹膜内、皮内、皮下、肌内或门静脉内注射)或连续输注的药用组合物无可见的颗粒物，并可包含 0.1 ng-100 mg 抗体，通常为 5 mg-25 mg 抗体。制备此药用组合物的方法是本领域技术人员周知的。在一个实施方案中，药用组合物包含 0.1 ng-100 mg 单位剂型的本发明治疗性抗体，可选地带有使用说明书。本发明的药用组合物可冻干，在给予前按照本领域技术人员众所周知或显而易见的方法再制。当本发明的实施方案包含具有 IgG1 同种型的本发明抗体时，可向药用组合物中加入铜螯合剂，例如柠檬酸盐(例如柠檬酸钠)或 EDTA 或组氨酸，以降低铜介导的该同种型抗体降解的程度，参见 EP0612251。

一般来说，给予本发明抗体的有效剂量和治疗方案凭经验确定，取决于患者的年龄、体重和健康状况以及要治疗的疾病或障碍之类的因素。这样的因素在主治医师的知识范围之内。关于选择合适剂

量的指引可见于例如 Smith 等(1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, New York, 但一般在 1 mg-1000 mg 之间。在一个实施方案中,治疗罹患 RA 的人患者的给药方案为 100 mg 或左右(即 50 mg-200 mg)的本发明抗体(或其抗原结合片段),每周或每两周皮下给予一次。本发明的组合物还可预防性使用。

根据要治疗的疾病或障碍,含治疗有效量的本发明抗体的药用组合物可与有效量的另一种药物同时、单独或序贯地使用,所述另一种药物例如为抗炎药物,例如 NSAID、氨甲喋呤、布西拉明、硫代苹果酸钠或一种或多种抗 TNF α 治疗物,例如 Enbrel™(依那西普)、Remicade™(英夫利昔单抗)、Humira™(阿达木单抗)和/或 CDP870。本发明的抗体可与有效量的抗 TNF α 受体抗体联用,参见 Davis MW 等(2000) *Ann Rheum Dis* 59 (suppl 1): 41-43。在其它实施方案中,本发明的抗体可与有效量的抗 IL-1/IL-1R (例如 Kineret™)、CTLA4-Ig、IL-6 (参见 Choy 等, (2002) *Ann. Rheum. Dis* 61 (suppl 1): 54)、IL-8、IL-15、VEGF、IL-17、IL-18 (参见 Taylor 等(2001) *Curr. Opin. Immunol.* 13: 611-616)的物质、抗-ICAM 和/或抗-CD4 抗体、抗 MMP 家族成员(例如 MMP-1、2、3 和/或 13)的物质联用。本发明的抗体还可与除去已知参与炎症过程的细胞的物质联用,例如使用 Mabthera™除去 CD20 阳性 B 细胞。与本发明抗体组合的其它治疗包括抗血管生成治疗,例如整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 的拮抗剂 Kringles 1-5 (参见 Sumariwalla P 等(2003), *Arthritis Res Ther* 5: R32-R39)、可溶性 Flt-1 (参见 Miotla 等, (2000) *Lab. Invest.* 80: 1195-1205)或抗 COX-2 物质。为方便起见,本发明还设想了含药用组合物的组件试剂盒,其含本发明抗体或其抗原结合片段部分,连同此另一种药物,并可选地带有使用说明书。而且,本发明提供含治疗有效量的本文所述单克隆治疗性抗体或其抗原结合片段的药用组合物,用于治疗对调节 OSM 的位点 II 与 gp130 之间的相互作用有反应的疾病。本发明还提供含治疗有效量的单克隆治疗性抗体的药用组合物,该抗体包含具有 SEQ. I.D. NO: 11 所列

序列的重链和具有 SEQ. I.D. NO: 12 所列序列的轻链。

本发明还提供含治疗有效量的单克隆治疗性抗体的药用组合物,该抗体包含具有 SEQ. I.D. NO: 50 所列序列的重链和具有 SEQ. I.D. NO: 51 所列序列的轻链。

4.1 既调节位点 II 相互作用又调节位点 III 相互作用的药用组合物

本发明的一个方面至少部分基于以下意想不到的发现: 用其各自的互作配偶体(即对于位点 II 为 gp130, 对于位点 III 为 OSMR β 和/或 LIFR 和/或用于结合第二个 OSM 分子的 gp130)同时调节 hOSM 的位点 II 和位点 III 的相互作用, 与调节这两个位点中单独任一个的相互作用相比, 表现出协同作用。

本发明因此提供调节 hOSM 与 gp130 和 LIFR 和/或 OSMR β 之间相互作用的方法, 该方法包含提供能够调节(即抑制或阻断) hOSM 的位点 II 与 gp130 之间相互作用的位点 II 拮抗剂, 以及提供能够调节(即抑制或阻断) hOSM 的位点 III 与 OSMR 和/或 LIFR 和 gp130 (用于结合第二个 OSM 分子)之间相互作用的位点 III 拮抗剂。与调节这两个位点中单独任一个的相互作用相比, 该方法具有协同作用。

本发明因此提供调节 hOSM 与 gp130 和 LIFR 和/或 OSMR β 之间相互作用的方法, 该方法包含提供能够调节(即抑制或阻断) hOSM 的位点 II 与 gp130 之间相互作用的位点 II 拮抗剂, 以及提供能够调节(即抑制或阻断) hOSM 的位点 III 与 OSMR 和/或 LIFR 之间相互作用的位点 III 拮抗剂。

在一个实施方案中, 提供含第一治疗性抗体和第二治疗性抗体的药用组合物, 第一治疗性抗体特异性结合 hOSM, 并调节 hOSM 与 gp130 之间的相互作用(位点 II 抗体, 其实例由本说明书提供), 第二治疗性抗体特异性结合 hOSM, 并调节 hOSM 与 OSMR 和/或 LIFR 之间的相互作用(位点 III 抗体, 其实例可以 MAB295, R&D systems 商购获得)。根据其在 ELISA 型实验中或如实施例所陈述调节(即抑

制或阻断) hOSM 与 OSMR β 和/或 LIFR 之间相互作用的能力, 即以其在实施例的 KB 实验中中和 OSM 并在实施例的 ELSIA 实验中不抑制 OSM 与 gp130 结合的能力, 可辨别第二治疗性抗体。

可根据其在实施例的 ELISA 实验中抑制 OSM 结合的能力辨别位点 II 抗体。通常, 第一和第二治疗性抗体皆为单克隆抗体。当然, 对本领域技术人员显而易见的是, 药用组合物不一定含两种拮抗实体(例如两种治疗性抗体实体), 因为有可能提供例如特异性结合 hOSM 并同时调节位点 II 和位点 III 与其各自互作配偶体相互作用的双特异性抗体。

在另一个实施方案中, 提供组件试剂盒, 其包含第一药用组合物和第二药用组合物, 可选地带有使用说明书, 第一药用组合物包含特异性结合 hOSM 并调节 hOSM 的位点 II 与 gp130 之间相互作用的治疗性抗体, 第二药用组合物包含特异性结合 hOSM 并调节 hOSM 的位点 III 与 OSMR β 和/或 LIFR 之间相互作用的治疗性抗体。

在另一个实施方案中, 还提供治疗罹患对 hOSM 及其互作配偶体(例如 gp130 以及 OSMR β 和/或 LIFR)之间的相互作用调节有反应的疾病或障碍(例如炎症性疾病或障碍(例如关节炎疾病, 例如类风湿性关节炎或骨关节炎))的人患者的方法, 该方法包括同时、序贯或分开给予治疗有效量的第一治疗性拮抗剂(例如抗体)和治疗有效量的第二拮抗剂(例如抗体), 第一治疗性拮抗剂特异性结合 hOSM, 并调节 hOSM 的位点 II 与 gp130 之间的相互作用, 第二拮抗剂特异性结合 hOSM, 并调节 hOSM 的位点 III 与 OSMR β 和/或 LIFR 之间的相互作用。

当然, 对本领域技术人员显而易见的是, 至少下述的第一拮抗剂(例如抗体)可实现和上文所述相同的目标: 即结合 gp130、并调节(例如阻断)(a) gp130 与 hOSM 之间以及(b) OSMR β 和/或 LIFR 与 hOSM 之间的相互作用的第一拮抗剂。

5. 临床应用

本发明的抗体可用于治疗对调节 hOSM 位点 II 与 gp130 之间相互作用的治疗有反应的各种疾病或障碍。特别要提到的是涉及产生病理水平 TNF α 的疾病或障碍(即 TNF α 介导的疾病或障碍)以及特征在于软骨(特别是关节软骨)分解或损坏的那些疾病或障碍。如上文所详述,本发明的抗体或者可作为单药疗法,或者可与另一种用于此炎性关节病(例如 RA)的治疗联合,用于治疗此炎性关节病。本发明的抗体可用于治疗临床已确诊形式的所述疾病,或用于预防在敏感患者中发作,或用于减慢或停止疾病向临床显著性发展。对于 RA 治疗,一旦出现疾病症状缓解,则本发明的抗体可用于防止复发。当患者罹患间歇型疾病时,本发明的抗体可用于延长疾病急性期之间的间隔。本发明的抗体还可用于治疗 RA 的关节外症状(例如 Felty 综合症)和/或治疗动脉粥样硬化斑的形成。对于 RA 治疗,可使用本发明抗体连同上文所述药物的组合。其它可由给予本发明抗体获益的关节病包括幼年发病性关节炎、银屑病性关节炎和强直性脊柱炎。

骨关节炎(OA)是一种起因未知的慢性退行性疾病,其特征不在于关节软骨和关节功能逐渐丧失。其目前被分为两类。原发性 OA 可为局部的或全身性的,后者在绝经后妇女中更为常见,出现 Heberdens 结节。继发性 OA 具有基础性病因,例如外伤、肥胖、Paget 病或炎性关节炎。关节软骨的丢失经常伴随着肥厚性骨变化,骨赘形成、软骨下骨增厚和滑膜发炎。特别要注意的是受承重关节(例如膝盖、手和髌)拖累的劳动能力丧失。OA 是一种使人极其衰弱的疾病,在其最严重时需要关节置换,以恢复活动性和终止关节疼痛。根据患者出现大骨赘的趋势,将髌骨关节炎分为肥厚型和萎缩型(参见 Solomon L (1976) J Bone Joint Surg 58, 176); 其它关节可能同样对该疾病的存在有反应。肥厚型 OA 可能与焦磷酸盐晶体沉积和弥漫性特发性骨质增生症相关。目前的治疗包括使用非鸦片类镇痛药(例如对乙酰氨基酚和曲马多(Tramadol))、NSAIDS (例如 Cox-2 特异性抑制

剂, 例如塞来考昔、罗非考昔)、鸦片类镇痛药和葡糖胺以及硫酸软骨素。因此, 在本发明的一个实施方案中, 提供在罹患骨关节炎(例如原发性或继发性)的人患者中治疗这种疾病的方法, 该方法包括给予所述患者如本文所述的治疗有效量的本发明治疗性抗体或其片段。本发明还涉及本发明的治疗性抗体连同另一种治疗物(特别是上述的一种或多种 OA 治疗物)的组合。

银屑病是一种具有显著发病率的慢性皮肤病, 影响约 2%的白种人群。尽管对许多人来说其是一种相对温和的疾病, 但对其对那些受影响的人可能具有深切影响。业已表明, 住院治疗的银屑病患者们的劳动能力丧失类似于心绞痛患者, 并接近于心力衰竭患者(Finlay 等, (1990); Br. J. Dermatol, 123, 751)。银屑病的最常见形式是慢性斑状疾病。其呈现出轮廓分明的红鳞状斑, 通常分布在头皮、下背和肢体伸肌表面。临床变症包括滴状干癣、脂漏型干癣和脓疱型疾病。少数患者还发展成血清阴性炎性关节炎。在显微镜下, 病变皮肤显示出角质形成细胞增殖和异常分化增加、活化 T-辅助淋巴细胞和嗜中性粒细胞浸润以及皮肤维管结构活化。这些变化对应于生长因子及其受体、促炎细胞因子和血管生成素的过表达。但是, 尽管进行了深入研究, 但该病的病原学和发病机理仍不明朗, 即便已在动物模型系统中证实了活化 T 细胞的核心作用(参见 Nickoloff 等(1999) Arch. Dermatol. 135, 546-552)。目前的治疗包括局部治疗, 例如维生素 D 类似物、皮质类固醇、二羟基蒽酚和类维生素 A, 例如他扎罗汀凝胶。光疗包括使用紫外线 B 或补骨脂素和紫外线 A 以及准分子激光照射。系统性类维生素 A 治疗包括依曲替酯和阿昔曲丁、异维甲酸、利阿唑。其它治疗包括氨甲蝶呤、羟基脲、环孢菌素和钙依磷酸酶拮抗剂、6-硫代鸟嘌呤、硫唑嘌呤、柳氮磺胺吡啶和富马酸酯。新近, 已提议或表明 Ontak™ (地尼白介素-2 (Denileukin Diftitox))、Zenapax™ (达克珠单抗(Daclizumab))、巴利昔单抗(Basiliximab)、抗 CD4 抗体、依法珠单抗(Efalizumab)、Alefacept™、Siplizumab、IDEC-114

和 BMS 188667 (CTLA4Ig)之类的生物治疗对治疗该疾病有用。而且, 抗 TNF α 治疗(例如 Enbrel™(依那西普)、Remicade™(英夫利昔单抗)、Humira™(阿达木单抗)和/或 CDP870)可与本发明抗体联合用于治疗银屑病(包括其临床变症)。

OSM在银屑病病变中的证据见于 Boifati 等(1998) Arch. Dermatol. Res 290: 9, 13。制瘤蛋白 M 由病变银屑病皮肤的短期器官培养物自发分泌(参见 Bonifati C 等, 出处同上)。而且, OSM受体下游主要信号传导分子 STAT3 在小鼠角质形成细胞中的组成型活化导致自发出现银屑病病变(参见 Sano S 等(2005) Nature Medicine 11: 43-49)。

本发明的抗体因此可作为单药疗法或与上文所述的这些治疗物组合, 用于治疗银屑病(慢性斑、滴状干癣、脂漏型干癣、脓疱型病、血清阴性炎性关节炎相关性银屑病)、特应性皮炎/湿疹、痤疮、鱼鳞病、天疱疮、病毒疣。

系统性红斑狼疮(SLE)是一种系统性自身免疫病, 其特征在于产生自身抗体、形成免疫复合物和免疫介导的组织损伤(综述于 Rheumatology (2003). Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt 和 Weisman 编辑, Pub. Mosby. 1291-1430)。病理表现包括纤维蛋白样坏死、苏木精小体、血管损伤以及皮肤真皮-表皮连接区断裂、炎性关节炎和肾小球性肾炎。SLE 可出现于任何年龄, 包括出现在新生儿中。其是侵袭生育期妇女的最常见疾病之一, 在妇女中比在男子中明显更为常见, 对非洲裔人的影响明显比白种人更频繁。其在美国的发病率估计为每 100,000 人每年 1.8-7.6 例。SLE 与主要由感染以及肾和 CNS 并发症引起的死亡率增加相关。狼疮及其并发症的治疗由各个患者的需要决定。非甾族抗炎药物是肌肉-骨骼症状、体质病征和慢性浆膜炎的重要一线疗法。抗疟疾药物(例如羟基氯喹、氯喹和阿的平)用于治疗非甾族和低剂量类固醇难治的肌肉-骨骼症状和体质病征。SLE 的大部分临床表现对类固醇治疗有反应, 但这些药物的副作用可能同时限制了治疗的剂量和时程。免疫抑制药物(尤其是硫唑嘌呤)可用

于更严重的疾病。最近，用消除 B 细胞的抗体 Rituxan (利妥昔单抗) 治疗已对 SLE 表现出有前途的成果(综述于 Looney RJ 等(2005) *Curr Dir Autoimmune* 8: 193-205)。业已发现，制瘤蛋白 M 在 SLE 患者血清中的水平提升，表明其水平与疾病活性相关(参见 Robak E 等(1997) *Eur Cytokine Netw* 8: 281-286)。因此，本发明涉及使用本发明的抗体(或作为单药疗法，或与一种或多种以上详述的当前 SLE 治疗物组合)治疗 SLE。

系统性硬化症(SS)包括硬皮病的变症和 Raynauds 现象，是一种皮肤和内脏器官的全身性疾病。其特征在于胞外基质在皮肤和内脏中累积。制瘤蛋白 M 可刺激过量的胞外基质累积(参见 Bamber B 等(1997) *J Mol Med Abstract* 76 卷: 61-69)。制瘤蛋白 M 由系统性硬化症患者的培养单核细胞自发产生(参见 Hasegawa M 等(1999) *Rheumatology (Oxford)* 38: 612-617)，并存在于硬皮病中肺纤维化支气管肺泡灌洗液中(综述于 Atama SP 和 White B (2003) *Cytokine growth Factor Rev* 14: 537-550)。因此，本发明涉及本发明抗体作为单药疗法或与另一种药物组合治疗 SS 及其变症的用途。

业已在急性肺损伤(特别是在肺炎情况下)患者的支气管肺泡灌洗液中检测出 OSM (Tamura S 等(2002) *Develop Dyman* 225: 327-331)。嗜中性粒细胞似乎是这些患者的 OSM 细胞源，BAL 液中的 OSM 浓度与 PMN 数有关联。因为嗜中性粒细胞为 OSM 源，并在活化时分泌 OSM，所以很可能 OSM 存在于其中嗜中性粒细胞为气道炎症(包括 COPD 和重症哮喘)显著组分的任意患者的肺中。另外，OSM 还由(小鼠)组织嗜酸性粒细胞表达，并在炎症过程中可为显著 OSM 源，参见 Tamura，出处同上。

使用腺病毒载体在小鼠气道中过表达 OSM，诱导了影响深远的嗜酸性粒细胞炎症和基质沉积(参见 Langdon C 等(2003) *J. Immunol.* 170: 548-555)以及 TIMP-1 表达(参见 Kerr C 等(1999) *J. Interfer. Cytokine Res.*, 19: 1195-1205)。小鼠肺成纤维细胞接触 OSM 刺激

Eotaxin 释放, Eotaxin 是一种有效的嗜酸性粒细胞趋化物。而且, OSM 刺激增殖, 诱导胶原蛋白产生, 并防止人肺成纤维细胞凋亡(参见 Scaffidi, A.K.等(2002) *Brit. J. Pharmacol* 136: 793-801)。尽管在这些观察结果背后的机制是未知的, 但基质沉积可能部分地为 α_1 蛋白酶抑制剂合成强特异性上调的结果(参见 Cichy, J.等(1998) *Biochem. J* 329: 335-339)。还已经发现, OSM 促进成纤维细胞依赖性肥大细胞增殖和组胺含量显著增加(参见 Gytoku E等(2001) *Arch. Dermatol. Res* 293: 508-514)。在离体大鼠肺中直接滴注 OSM 诱发快速而持续的 IL-6 分泌(参见 Li, H.L. (2002) *J. Drug Targ* 10: 55-62)。因此, 本发明涉及本发明抗体(作为单药疗法或与另一种药物的组合)治疗炎性肺病(例如哮喘和 COPD (慢性阻塞性肺病))的用途。

业已在多发性硬化(MS)患者的脑中检测出 OSM, 在脑中 OSM 位于小胶质细胞、星形细胞和浸润白细胞中(参见 Ruprecht K 等 *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 60 (11): 1087-98, 2001 Nov)。OSM 诱导脑内皮细胞分泌 IL-6 和 MCP-1, 加入 TNF α 和 OSM 产生协同反应。OSM 还诱导 ICAM1 在脑微血管内皮细胞上表达, 其可增强脑组织中的白细胞浸润(Ruprecht K 等, 出处同上)。除了促进脑中的炎症以外, OSM 还可直接促成神经元丢失。HIV 患者的单核细胞上清液对成神经细胞生长产生显著抑制, 还引起神经细胞死亡, 已表明这些作用的介导体为制瘤蛋白 M。因为许多 HIV 患者罹患神经元细胞丢失引起的脑萎缩, 所以 OSM 可能是此病理的一种介导体。显然, OSM 还可在其中发生神经元丢失的其它 CNS 疾病中起作用。令人感兴趣的是, 在阿尔茨海默病(AD)中, α_1 抗凝乳蛋白酶(ACT)是淀粉样相关蛋白中的一种, 其表达在病区急剧增加, 可能有利于异常蛋白在淀粉样斑和神经纤维缠结中的沉积。已知由浸润活化 T 细胞和单核细胞二者以及小胶质细胞分泌的 OSM 是 ACT 的有效诱导物, 因此可有助于 AD 病理学(参见 Kordula T 等(1998) *J Biol. Chem.* 273: 4112-4118 和 Kordula T *Journal of Neuroscience*. 20 (20): 7510-6,

2000)。

Tamura 等的工作提示, OSM 可能涉及神经性疼痛的发展和维持(参见 Tamura S.等(2003) *Eur. J. Neurosci.* 17: 2287-2298)。他们的研究揭示,一部分感受伤害性感觉神经元表达 OSM β 受体。所有的 OSM β R⁺ve 神经元还表达 VR1 和 P2X3 受体,已表明这些受体对神经性疼痛和炎性疼痛二者的发展是决定性的(参见 Jarvis M.F.等(2002) *PNAS* 99: 179-184 和 Walker K.M 等(2003) *J. Pharmacol. Exp. Ther* 304, 56-62)。而且, OSM^{-/-}小鼠降低了对化学、热、内脏和机械疼痛的有害反应,这与 VR1⁺ve P2X3⁺ve 小神经元的减少有关(参见 Morikawa, Y.等(2004): *J Neurosci* 24, 1941-1947)。

因此,本发明还涉及本发明抗体(作为单药疗法或与另一种药物的组合)在例如上述的中枢神经系统疾病或障碍(例如多发性硬化(MS)、阿尔茨海默病(AD)和其它痴呆)治疗中的用途,而且涉及其在疼痛(特别是神经性疼痛和/或炎性疼痛)治疗中的用途。

OSM 存在于动脉粥样硬化病变的组织巨噬细胞中(参见 Modur V. 等 *J. Clin Invest.* 100, 158-168), 并作为血管生成因子可提升动脉粥样硬化斑的新血管形成特征,该特征被认为导致血管壁脆性。像血管生成反应一样, OSM 既诱导 IL-6 在内皮细胞中分泌(在内皮细胞中 OSM 的作用与 IL-1 和 TNF α 分别是加成性或协同性的),又诱导 COX-2 表达(参见 Brown J.T 等(1991) *J. Immunol.* 147: 2175-2180)。内皮细胞诱导 COX2 是 OSM 的血管生成特性所必需的(参见 Brown J.T 等, 出处同上)。但是, OSM 还诱导其它血管生成因子 VEGF (Vasse, M 等(1999) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 1835-1842)和 bFGF (Wijeloh E.S.等(1997) *J. Cell Sci* 110: 871-879)在内皮细胞中表达。令人感兴趣的是,人内皮细胞所具有的 OSM 受体密度是其它细胞的约 10-20 倍(参见 Modur V.等, 出处同上)。

除了对内皮的作用以外, OSM 还诱导 IL-6 和 COX-2 在血管平滑肌细胞(VSMC)中表达,以及引起细胞形态学的显著变化(Bernard C.

等(1999) *Circ. Res.* 85: 1124-1131)。钙沉积物经常存在于其中巨噬细胞为主要炎性细胞的晚期动脉粥样硬化病变中。巨噬细胞是 OSM 的主要来源,令人感兴趣的是,该细胞因子可在 VSMC 培养物中诱导骨型碱性磷酸酶和钙沉积(Shioi A.等(2002) *Circ. Res.* 91: 9-16)。OSM 还分别诱导和抑制 VSMC 分泌组织因子(TF)和 TF 通道抑制剂(TFPI),在 VSMC 培养上清液中产生有效的促凝血活性(Mirshahi F.等(2002) *Blood Coag. Fibrinol.* 13: 449-455)。而且,OSM 稍稍影响内皮细胞分泌 von-Willebrand 因子、组织型纤溶酶原活化物和 PAI-1,这提示“OSM 可能在动脉粥样硬化病变发展中起关键作用”(Portau J 等(1998) *Blood Coag. Fibrinol.* 9, 609-615)。

纤维蛋白原血浆水平是一种重要的血管危险参数,在用肝癌细胞系进行的研究中,OSM 是一种有效的纤维蛋白原分泌诱导物(Vasse. M 等(1996) *Haemostasis* 26, suppl 4, 331-339)。但是,在高浓度(50 ng/ml)时,OSM 还增加人 LDL 受体表达(Liu 等(2003) *Aterio. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 90-96)。最后,OSM 在 J774 单核细胞-巨噬细胞中促进胆固醇酯化,因此可能在动脉粥样硬化病变的泡沫细胞发展中促进该过程(Maziere C 等(1996) *Biochem. Biophys Acta* 1300, 30-34)。

因此,本发明涉及本发明抗体在心血管系统疾病或障碍治疗中的用途。另外设想了本发明抗体在动脉粥样硬化和内皮细胞起源的疾病治疗中的用途。进一步设想了本发明抗体在 HIV 感染患者治疗中的用途,特别是用于治疗由病毒感染所致的疾病(例如卡波西肉瘤)。

本发明的抗体还可用于细胞周期调节疾病,例如癌症(例如前列腺癌)、骨髓瘤。

尽管已就人类疾病或障碍的治疗大体描述了本发明,但本发明还可用于治疗非人哺乳动物中的相似疾病或障碍。

表 A

蛋白或多核苷酸(PN)	抗体 15E10	抗体 10D3
CDRH1	SEQ. I.D. NO:1	SEQ. I.D. NO:40
CDRH2	SEQ. I.D. NO:2	SEQ. I.D. NO:41
CDRH3	SEQ. I.D. NO:3	SEQ. I.D. NO:42
CDRL1	SEQ. I.D. NO:4	SEQ. I.D. NO:43
CDRL2	SEQ. I.D. NO:5	SEQ. I.D. NO:44
CDRL3	SEQ. I.D. NO:6	SEQ. I.D. NO:45
V _H 结构域(鼠)	SEQ. I.D. NO:7	SEQ. I.D. NO:46
V _L 结构域(鼠)	SEQ. I.D. NO:8	SEQ. I.D. NO:47
V _H 结构域(人源化, B3)	SEQ. I.D. NO:9	SEQ. I.D. NO:48
V _L 结构域(人源化, L2)	SEQ. I.D. NO:10	SEQ. I.D. NO:49
重链(人源化)	SEQ. I.D. NO:11	SEQ. I.D. NO:50
轻链(人源化)	SEQ. I.D. NO:12	SEQ. I.D. NO:51
V _H 结构域(鼠, PN)	SEQ. I.D. NO:15	SEQ. I.D. NO:52
V _L 结构域(鼠, PN)	SEQ. I.D. NO:16	SEQ. I.D. NO:53
V _H 结构域(人源化, PN, B3)	SEQ. I.D. NO:17	SEQ. I.D. NO:54
V _L 结构域(人源化, PN, L2)	SEQ. I.D. NO:18	SEQ. I.D. NO:55
重链(人源化, PN)	SEQ. I.D. NO:19	SEQ. I.D. NO:56
轻链(人源化, PN)	SEQ. I.D. NO:20	SEQ. I.D. NO:57
V _H 结构域(B4, 人源化)	SEQ. I.D. NO:21	N/A
重链(人源化, Fc 突变)	SEQ. I.D. NO:61	N/A
重链(人源化, Fc 突变, PN)	SEQ. I.D. NO:62	N/A

现在仅利用实施例描述本发明。所附权利要求书可包括一个或多个以下实施例的概括。

实施例

实施例 1-6 涉及抗体 15E10 的生产和工程化。实施例 7 涉及抗

体 10D3 的生产和工程化。

1. 单克隆抗体的产生

一般按照 E Harlow 和 D Lane, *Antibodies a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 中所陈述的方法, 由杂交瘤生产单克隆抗体。小鼠骨髓瘤细胞和靶抗原免疫小鼠的 B 淋巴细胞融合。骨髓瘤融合配偶体使杂交瘤细胞无限增殖化, 同时由 B 淋巴细胞提供产生抗体的能力。

通过腹膜内注射在 CHO 细胞中生产的糖基化人 OSM (hOSM) 的 RIBI 佐剂(Sigma)悬浮液, 免疫 4 只 SJL 小鼠。在 2 周后, 用单独的 hOSM 加强免疫小鼠, 接着, 再过 2 周后, 用已用抗位点 III 单克隆抗体(OM4/11.17; OSM:Mab 1:1.5 重量:重量)中和的 hOSM 加强免疫小鼠, 以将免疫应答导向位点 II, 接着, 在另外 2.5 周后再用 OSM-MAb 复合物加强免疫小鼠, 最后在 5 周后用单独的 OSM 加强免疫小鼠。在初次免疫后 3 个月, 取出脾, 使用 PEG1500 (Boehringer)将 B 淋巴细胞与来源于 P3X 细胞的小鼠骨髓瘤细胞融合, 以产生杂交瘤。通过有限稀释克隆单个杂交瘤细胞系(E Harlow 和 D Lane)。显微镜下鉴别含单个集落的孔, 测试上清液的活性。扩增来自活性最高克隆的细胞, 用于低温贮藏、抗体生产等。初始的 OSM 抗体选择是基于在 gp130 抑制 ELISA 和 KB 细胞实验中评价的中和人糖基化 OSM 的特异性和效力, (参见下文), 后一实验提供 OSM 特异性检查。在鉴别出足够效力和正确特异性的抗体之后, 应用进一步的选择标准:

- 1/ 对猕猴 OSM 的交叉反应性
- 2/ 在混合的人 AB 血清存在下维持抗人 OSM 的活性
- 3/ 维持抗人嗜中性粒细胞 OSM 文库的活性和抗 RA 滑液细胞源 OSM 的活性

在 gp130 抑制 ELISA 中筛选 1920 个杂交瘤。43 个产生超过 50%

的抑制，对 15 个进行有限剂量反应实验，选择其中 6 个用于进一步的研究。对这 6 个进行亚克隆，并选择主克隆。

根据效力选择两个抗体：克隆 15E10 和克隆 10D3 (参见实施例 7)。15E10 鼠抗体在 gp130 抑制 ELISA 中一直更有效，但当人 OSM 为靶抗原时，在 KB 细胞实验中所具有的效力类似于 10D3。但是，在两个实验中，15E10 鼠抗体抗猕猴 OSM 的效力都远超过 10D3。

2. 克隆 15E10 可变区的克隆

由克隆 15E10 杂交瘤细胞提取总 RNA，使用鼠前导序列特异性引物和按照预定同种型(IgG2a/κ)的抗体恒定区，通过逆转录产生重链和轻链可变区结构域的 cDNA。然后将重链和轻链结构域的 cDNA 克隆入载体 pCR2.1 中，用于测序。

2.1 RNA 提取

使用 Promega 的 SV 总 RNA 分离系统，按照生产商的说明，由杂交瘤克隆 15E10 的 10^6 细胞的沉淀中提取总 RNA。

2.2 逆转录

使用对鼠前导序列和鼠 IgG γ 2a/κ 恒定区特异性的引物逆转录 RNA，以产生重链和轻链可变结构域的 cDNA。所使用引物的混合物陈述于 Jones ST 和 Bendig MM Bio/technology 9: 88-89 (1991)。

制备 50 μ M 鼠 V_H 和 V_L 前导序列正向引物的混合物。还制备 50 μ M 鼠 γ 2a 和 κ 恒定区反向引物的溶液。

2.3 逆转录 PCR (RT-PCR)

使用 Promega 的 Access RT-PCR 系统，按照生产商的说明，以双份对编码重链和轻链可变区的 RNA 进行逆转录。 V_H 和 V_L 正向和反向引物如上所述。

3. 2.3 的 PCR 产物的克隆

3.1 凝胶纯化

将 RT-PCR 产物($2 \times V_H$ 和 $2 \times V_L$)的凝胶上样液上至含 0.01%溴化乙锭的制备型 1%琼脂糖凝胶中,并在 TAE 缓冲液中以 100 V 电泳 1 小时,切下 V 区条带。另将 100 bp 的 DNA 梯在凝胶上电泳,以允许鉴别 V_H 和 V_L 条带。

使用 Qiagen 的 QIAquick™凝胶提取试剂盒,按照生产商的说明,由凝胶提取和纯化 DNA 片段。

3.2 连接

使用 Invitrogen 的 TA 克隆试剂盒,按照生产商的说明,将纯化的 RT-PCR 片段($2 \times V_H$ 和 $2 \times V_L$)克隆入 pCR2.1 载体中。

3.3 转化

按照 TA 克隆试剂盒说明将连接的质粒转化入 TOP10F' 细胞中。将 50 μ l 和 200 μ l 的转化细胞涂布在 L-琼脂平板上,该琼脂平板含 100 μ g/ml 氨苄青霉素,并覆盖 8 μ l 500 mM IPTG 溶液和 16 μ l 50 mg/ml X-Gal 的 DMF 溶液。于 37°C 过夜温育平板。

3.4 测序

在 5 ml 补加 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中于 37°C 过夜培养 5 个白色菌落。

使用 Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit,按照生产商的说明,提取和纯化含 15E10 V_H 和 V_L 结构域的 pCR2.1 质粒。

使用引物 T7、M13 for 和 M13 rev 对 V_H 和 V_L 结构域测序。

15E10 V_H 结构域氨基酸序列(2 个 RT-PCR 反应的 10 个克隆的共有序列): SEQ. I.D. NO: 7

15E10 V_L 结构域氨基酸序列(2 个 RT-PCR 反应的 10 个克隆的共

有序列): SEQ. I.D. NO: 8

4. 嵌合抗体

设计由嫁接在人 IgG1/ κ 野生型 C 区上的 3.4 的亲代鼠 V 区组成的嵌合抗体, 以证实正确的鼠 V 区的克隆, 在测试人源化构建物时, 该嵌合抗体又用作参比。嵌合抗体在 CHO 细胞中表达, 纯化嵌合抗体, 并在 gp130 抑制 ELISA 和 KB 细胞实验中测试其对 OSM 位点 II 的亲合力(参见下文)。

通过 PCR 扩增克隆的鼠 V 区, 以导入克隆入哺乳动物表达载体 Rld 和 Rln 所需的限制性位点。Hind III 和 Spe I 位点设计用于框定 V_H 结构域, 并允许克隆入含人 $\gamma 1$ 野生型 C 区的改良 Rld 载体中。Hind III 和 BsiW I 位点设计用于框定 V_L 结构域, 并允许克隆入含人 κ C 区的改良 Rln 载体中。

4.1 PCR 扩增

V_H 正向引物: 5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGC TGT CCT AGG GCT ACT C-3' (SEQ. I.D. NO: 22)

Hind III 限制性位点加下划线, Kozak 序列为粗体。

V_H 反向引物: 5'-GAT GGA CTA GTG TCC CTG TGC CCC AGA C-3' (SEQ. I.D. NO: 23)

Spe I 限制性位点加下划线。

V_L 正向引物: 5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGA TTT TCA GGT GCA GAT T-3' (SEQ. I.D. NO: 24)

Hind III 限制性位点加下划线, Kozak 序列为粗体。

V_L 反向引物: 5'-GAT GCG TAC GTT TGA TTT CCA ACT TTG TCC C-3' (SEQ. I.D. NO: 25)

BsiW I 限制性位点加下划线

PCR 反应:	水	66 μ l
	10 \times PCR 缓冲液	10 μ l
	dNTP (2 mM)	10 μ l
	引物 1 (5 μ M)	4 μ l
	引物 2 (5 μ M)	4 μ l
	AmpliTaq 聚合酶	2 μ l
	纯化的质粒	4 μ l
	总体积	100 μ l

引物 1: V_H 或 V_L 正向引物

引物 2: V_H 或 V_L 反向引物

纯化的质粒: 通过 Qiagen Minipreps 纯化的 pCR2.1 V_H 或 V_L 质粒(稀释 200X)

PCR 循环:	1- 95 $^{\circ}$ C, 4 分钟
	2- 95 $^{\circ}$ C, 1 分钟
	3- 55 $^{\circ}$ C, 1 分钟
	4- 72 $^{\circ}$ C, 1 分钟
	5- 72 $^{\circ}$ C, 7 分钟

步骤 2-4: 重复 30 次

4.2 克隆入哺乳动物表达载体

使用 Qiagen 的 MinElute PCR 纯化试剂盒, 按照生产商的说明, 纯化 PCR 产物。

4.2.1 限制性消化

用 Hind III-Spe I 消化 V_H PCR 产物和 Rld hC γ 1wt 哺乳动物表达载体:

10 \times 缓冲液(NEBuffer2)	5 μ l
BSA 100x (NEB)	0.5 μ l

DNA	5 μ l
Hind III (Promega)	2 μ l
Spe I (NEB)	2 μ l
水	35.5 μ l
总体积	50 μ l

DNA: 纯化的 V_H PCR 产物或 Rld hC γ 1wt 载体(以 0.25 mg/ml)于 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

用 Hind III-BsiW I 消化 V_L PCR 产物和 Rln hC κ 哺乳动物表达载体:

10 \times 缓冲液(NEBuffer2)	5 μ l
DNA	5 μ l
Hind III (Promega)	2 μ l
水	38 μ l
总体积	50 μ l

DNA: 纯化的 V_L PCR 产物或 Rln hC κ 载体(以 0.25 mg/ml)于 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

加入 2 μ l BsiW I (NEB), 并于 55 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。

4.2.2 凝胶纯化

将限制性消化产物的凝胶上样液上至含 0.01% 溴化乙锭的制备型 1% 琼脂糖凝胶中, 并在 TAE 缓冲液中以 100 V 电泳 1 小时, 切下 Rld 和 Rln 载体以及 V_H 和 V_L PCR 片段条带。另将 100 bp 的 DNA 梯在凝胶上电泳, 以允许鉴别 V_H 、 V_L 和载体条带。

使用 Qiagen 的 QIAquick 凝胶提取试剂盒, 按照生产商的说明, 由凝胶提取和纯化 DNA。

4.2.3 连接

将 Hind III-Spe I 消化的 V_H PCR 片段连接至 Hind III-Spe I 消化

的 Rld hC γ 1wt 载体中。

将 Hind III-BsiW I 消化的 V_L PCR 片段连接至 Hind III-BsiW I 消化的 Rln hC κ 载体中。

使用 Promega 的 LigaFast 快速 DNA 连接系统，按照生产商的说明进行连接，获得：

- V_H: 载体：Hind III-Spe I 消化的 Rld hC γ 1wt
 插入片段：Hind III-Spe I 消化的 V_H PCR 片段
- V_L: 载体：Hind III-BsiW I 消化的 Rln hC κ
 插入片段：Hind III-BsiW I 消化的 V_L PCR 片段

4.2.4 转化

将连接产物转化入 DH5 α 感受态细胞中：

在冰上融解 200 μ l DH5 α 小瓶。

在转化管中制备 50 μ l 等份。

加入 2 μ l 连接混合物，并用吸管尖端轻轻混合，接着在冰上温育 30 分钟。

在未振荡的情况下将混合物于 42 $^{\circ}$ C 温育 45 秒。

然后将其转移入冰中达 2 分钟。

加入 450 μ l SOC 培养基，将管在振荡培养箱上于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。

将 100 μ l 培养物涂布在补加 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 L-琼脂平板上，并于 37 $^{\circ}$ C 过夜温育。

4.2.5 测序

在 5 ml 补加 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养 V_H 和 V_L 克隆。

使用 Qiagen 的 QIAprep Spin Miniprep Kit，按照生产商的说明，提取和纯化分别含 V_H 和 V_L 结构域的 Rld 和 Rln 质粒。

使用在 R1d 载体中的正向引物和信号序列以及在人 C γ 1 区中的反向引物对 V_H 区测序。

使用在 R1n 载体中的正向引物和信号序列以及在人 C κ 区中的反向引物对 V_L 区测序。

鉴别具有正确的 V_H 和 V_L 序列的克隆，并制备用于在 CHO 细胞中表达的质粒。

4.3 嵌合抗体在 CHO 细胞中的表达

将分别含 15E10 V_H 和 V_L 结构域的 R1d 和 R1n 质粒瞬时共转染入 CHO 细胞中并进行表达。通过在重组 A 蛋白 Sepharose 上的亲和层析由细胞培养上清液纯化所产生的嵌合抗体，并在 gp130 抑制 ELISA 和 KB 细胞实验中评价其对 OSM 的亲合力(参见下文)。

4.3.1 质粒纯化

将含 R1d-15E10V_H 和 R1n-15E10V_L 质粒的 DH5 α 细胞在 5 ml 补加 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中于振荡培养箱内 37 $^{\circ}$ C 培养 8 小时。

用 1 ml 的 8 小时工作日培养物接种 200 ml 补加 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基，并在振荡培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 过夜温育。

使用 Qiagen 的 QIAfilter Plasmid Maxi Kit，按照生产商的说明，提取和纯化质粒。将乙醇沉淀重悬浮在 200 μ l TE 缓冲液中，并在 100 倍稀释母液后以 260 nm 的吸光度测定质粒浓度。

4.3.2 转染

在 4 \times 175 cm² BD Falcon 组织培养瓶中，在补加超低胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的含 Glutamax-1 Dulbecco MEM (DMEM)培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养 CHO 细胞至铺满。

对于每个瓶，在 50 ml Falcon 管中，加入以下物质并在涡旋下混

合:

含 Glutamax-1 的 8 ml Optimem 1

20 μg R1d-15E10V_H 纯化质粒

20 μg R1n-15E10V_L 纯化质粒

240 μl TransFast 转染试剂

将混合物于室温(RT)温育 10-15 分钟。去除瓶中的 DMEM 培养基, 然后涡旋混合该混合物, 并加入到瓶中。

将混合物于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 小时。

向瓶中加入 32 ml Optimem, 并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 48-72 小时。

4.3.3 嵌合抗体的纯化

合并所有 175 cm^2 瓶的培养基, 并在 MSE Mistral 2000 上以 1500 rpm 离心 3 分钟, 上清液通过 500 mL 的 Filter System 0.22 μm CA。

在使用 Unicorn 软件的 Amersham Biosciences Akta Explorer 上由澄清的上清液纯化抗体。

使用的柱为 1 ml HiTrap rProtein A Sepharose FF。

流速为 1 ml/分钟。

柱子用 10 CV (柱体积) Dulbecco PBS 平衡, 然后通过泵 A 加载澄清的上清液。

用 20 CV Dulbecco PBS 流洗柱, 将泵 A 流洗至无上清液, 再使 10 CV Dulbecco PBS 通过柱, 以确保上清液被完全清除。

用 10 CV ImmunoPure IgG 洗脱缓冲液(Pierce)洗脱抗体, 并以含 100 μl 1 M Trizma-HCl pH 8.0 中和缓冲液的 1 ml 级分进行收集。

用 5 CV Dulbecco PBS 再平衡柱。

通过于 280 nm 读取相对于空白溶液的吸光度, 定量洗脱级分中的抗体, 空白溶液含 10 体积 ImmunoPure IgG 洗脱缓冲液+1 体积 1 M Trizma-HCl pH 8.0, 合并具有足量纯抗体的级分, 并以 100 μl 等份储存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

4.4 嵌合抗体分析

在 gp130 抑制 ELISA 和 KB 细胞实验中分析纯化的 15E10 和 10D3 (参见下文)嵌合抗体中和人和猕猴 OSM (hOSM 和 cOSM)二者的效力。下文陈述了 gp130 抑制 ELISA 和 KB 细胞实验的方法。

表 1: 15E10 和 10D3 鼠抗体和嵌合抗体的 IC₅₀ (μg/ml)值

	gp130 ELISA	KB 细胞实验
15E10 鼠抗体	0.059	0.195
15E10 嵌合抗体	0.036	0.110
10D3 鼠抗体	0.107	0.114
10D3 嵌合抗体	0.057	0.107

在 gp130 抑制 ELISA (图 2)和 KB 细胞实验(图 3)中, 15E10 和 10D3 嵌合抗体均中和 hOSM 和 cOSM。嵌合抗体 15E10 对猕猴 OSM 的亲合力比嵌合抗体 10D3 高, 用亲代鼠抗体所观察到的结果也是一样。两种嵌合抗体均具有类似于亲代鼠抗体的曲线型式和 IC₅₀ 值(表 1)。猕猴 OSM (cOSM)的氨基酸序列和 cDNA 序列分别陈述于 SEQ. I.D. NO: 63 和 64;

SEQ.I.D.NO: 63:

MGVPLTRRTLLSLILALLFPSMASMAAMGSCSKEYRMLLGQLQKQTDLMQDTSR
LLDPYIRIQGLDIPKLREHCRESPGAFPSEETLRGLGRRGFLOTLNATLGCVLH
RLADLEQHLPKAQDLERSGLNIEDLEKLMARPNVLGLRNNVYCAQLLDNSDM
TEPTKAGRGTPQPPTPTPTSDVFQRKLEGCSFLRGYHRFMHSVGRIFSKWGESP
NRSRRHSPHQALRKGVRRTRPSRKGNRMLMPRGQLPR

SEQ.I.D.NO: 64:

ATGGGGGTACCGCTCACACGGAGGACGCTGCTCAGTCTGATCCTTGCACTCCTG
 TTTCCAAGCATGGCAAGCATGGCGGCTATGGGCAGCTGCTCGAAAGAGTACCGC
 ATGCTCCTTGGCCAGCTCCAGAAGCAGACAGATCTCATGCAGGACACCAGCAGG
 CTCCTGGACCCCTATATACGTATCCAAGGCCTGGATATTCCTAAACTGAGAGAG
 CACTGCAGAGAGAGCCCTGGGGCCTTCCCCAGCGAGGAGACCCTGAGGGGGCTG
 GGCAGGCGGGGCTTCCTACAGACGCTCAATGCCACACTGGGCTGCGTCCTGCAC
 AGACTGGCCGACTTAGAGCAGCATCTCCCAAGGCCAGGACTTGAGAGAGGTCT
 GGGCTGAACATAGAGGACTTAGAGAAGCTGCAGATGGCGAGGCCGAATGTCCTC
 GGGCTCAGGAACAACGTCCTACTGCATGGCCCAGCTGCTGGACAACCTCAGACATG
 ACTGAGCCCAAGGCGGCGGGGACCCCTCAGCCGCCACCCCCACCCCT
 ACCTCAGATGTTTTTCAGCGCAAGCTGGAGGGCTGCAGTTTCCTGCGTGGCTAC
 CATCGCTTCATGCACTCAGTGGGGCGGATCTTCAGCAAGTGGGGGGAGAGCCCG
 AACCGGAGCCGGAGACACAGCCCCACCAGGCCCTGCGAAGGGGGTGCAGCAGG
 ACGAGACCCTCCAGGAAAGGCAATAGACTCATGCCAGGGGACAGCTGCCCCGG
 TAG

这些结果证实，已成功地克隆了正确的 15E10 可变区，产生能够结合人和猕猴 OSM 位点 II 二者的抗原结合嵌合抗体。现在可人源化 15E10 重链和轻链可变结构域。

5.1.1 搜索小鼠数据库

通过搜索肽数据库，鉴别出 15 个与 15E10 V_H 氨基酸序列具有最高同源性的鼠序列和 10 个与 V_L 氨基酸序列具有最高同源性的鼠序列。

对比 15E10 V_H 氨基酸序列和由数据库搜索获得的全部 15 个鼠序列，鉴别出以下的重要构架残基：

位置	15E10 V _H	小鼠	出现率
75	R	K	15/15
105	T	Q	14/15

位置符合上文所述的 Kabat 等的编号系统。对比 15E10 V_L 氨基酸序列和 10 个由数据库搜索获得的鼠序列，鉴别出以下的重要构

架残基:

位置	15E10 V _L	小鼠	出现率
9	T	A	8/10
38	E	Q	10/10
49	E	Y	10/10
60	A	V	10/10

5.1.2. 搜索人数据库

使用 EasyBlast 在肽数据库中鉴别与 15E10 V_H 和 V_L 构架具有最高同源性的入构架序列。

对 15E10 V_H 鉴别出两组入序列:

组 A, 选择其中的以下构架进行入源化:

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSS
GSTNYNPSLKSRTTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARSPSSGSYYYYY
YGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ.I.D.NO:26)

CDR 加下划线。

组 B, 选择其中的以下构架进行入源化:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLGGPLYWYF
DLWGRGTLVTVSS (SEQ.I.D.NO:27)

CDR 加下划线。

以下的构架残基被鉴别为对恢复亲和力可能很重要, 并可能需要回复突变:

位置(Kabat 编号)	15E10 V _H	组 A	组 B
27	F	G	F
28	S	S	T
29	L	I	F
30	T	S	S
48	L	I	V

49	G	G	A
67	L	V	F
71	K	V	R
73	N	T	N
78	V	F	L
94	K	R	R

设计 8 个具有不同回复突变的人源化 V_H 构建物, 4 个基于组 A 的人构架(A1、A2、A3 和 A4), 4 个基于组 B 的人构架(B1、B2、B3 和 B4)。

对于 15E10 V_L , 鉴别出一组人序列, 选择其中的以下序列进行人源化:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSKYLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNR
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKLEI
 (SEQ.I.D.NO:28)

CDR 加下划线。

以下的残基被鉴别为对恢复亲和力可能很重要, 并可能需要回复突变:

位置(Kabat 编号)	15E10 V_L	人 V_L
49	E	Y
71	Y	F

设计 2 个构建物, 一个为直接嫁接物(L1), 另一个在两个残基都具有回复突变(L2)。

人源化 V_H 构建物 A1:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKLEWIGVIWRG
GSTDYNAAFMSRVTISVDTSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGQGTTT (SEQ.I.D.NO:29)

人源化 V_H 构建物 A2:

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
 GSTDYNAAFMSRVTI SKDTSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGQGTTT (SEQ.I.D.NO:30)

人源化 V_H 构建物 A3:

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
 GSTDYNAAFMSRVTI SKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGQGTTT (SEQ.I.D.NO:31)

人源化 V_H 构建物 A4:

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
 GSTDYNAAFMSRLTI SKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGQGTTT (SEQ.I.D.NO:32)

人源化 V_H 构建物 B1:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARSNSNFYWFYFD
 VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:33)

人源化 V_H 构建物 B2:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:34)

人源化 V_H 构建物 B3:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRFTI SKDNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:35)

人源化 V_H 构建物 B4:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRLTI SKDNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:36)

人源化 V_L 构建物 L1:

EIVLTQSPATLSLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYDTSNLA
 SGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIK
 (SEQ.I.D.NO:37)

人源化 V_L 构建物 L2:

EIVLTQSPATLSLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIEDTSNLA
 SGIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIK
 (SEQ.I.D.NO:38)

5.2 15E10 的人源化

通过构建重叠寡核苷酸从头制备人源化 V_H 和 V_L 构建物, 所述重叠寡核苷酸含用于克隆入 Rld 和 Rln 哺乳动物表达载体中的限制性位点以及人信号序列。引入 Hind III 和 Spe I 限制位点, 以框定含人信号序列的 V_H 结构域, 用于克隆入含人 γ 1 野生型恒定区的 Rld 中。引入 Hind III 和 BsiW I 限制位点, 以框定含人信号序列的 V_L 结构域, 用于克隆入含人 κ 恒定区的 Rln 中。

人信号序列: MGWSCIILFLVATATGVHS (SEQ. I.D. NO: 39)。设计 8 个人源化 V_H 构建物和 2 个人源化 V_L 构建物。这能产生 16 种不同链组合。因为可变区的寡核苷酸构建耗时, 所以最初决定仅制备 V_H 结构域的最少和最多回复突变构建物(A1、A4、B1 和 B4), 并生产与两个人源化 V_L 构建物组合的人源化抗体。

设计 10 个寡核苷酸用于构建, 这 10 个寡核苷酸长为 60 个碱基, 具有最少 18 个碱基重叠。

5.2.1 寡核苷酸构建

由 5 μ l 100 μ M 的各寡核苷酸母液制备寡核苷酸混合溶液。一般按照 Stemmer WP 等(1995) Gene 164(1): 49-53, 使用描述于 Ertl PF 等(2003) Methods 31: 199-206 的软件, 通过构建重叠寡核苷酸进行人源化 V_H 和 V_L 基因的合成。

5.2.1.1 组装 PCR 反应:

水	41.5 μ l
10 \times ProofStart PCR 缓冲液	5 μ l
dNTP (10 mM)	1.5 μ l
寡核苷酸混合物	1 μ l
ProofStart DNA 聚合酶	1 μ l
总体积	50 μ l

装配 PCR 循环:

- 1- 94 $^{\circ}$ C, 2 分钟
 - 2- 94 $^{\circ}$ C, 30 秒
 - 3- 40 $^{\circ}$ C, 2 分钟
 - 4- 72 $^{\circ}$ C, 10 秒
 - 5- 94 $^{\circ}$ C, 15 秒
 - 6- 40 $^{\circ}$ C, 30 秒
 - 7- 72 $^{\circ}$ C, 20 秒+3 秒/循环
- 步骤 4-7 重复 25 次。

5.2.1.2 恢复 PCR

引物 1 和 2 是首个用于装配 PCR 的上游和下游寡核苷酸。恢复 PCR 允许扩增完整 V 基因。

恢复 PCR 反应:

水	42 μ l
10 \times ProofStart PCR 缓冲液	4 μ l
dNTP (10 mM)	1.5 μ l
引物 1 (100 μ M)	0.5 μ l
引物 2 (100 μ M)	0.5 μ l
装配 PCR 反应物	1 μ l
ProofStart DNA 聚合酶	0.5 μ l
总体积	50 μ l

	引物 1	引物 2
15E10-A1/A4	15E10-A4-U1	15E10-A4-L1
15E10-B1	15E10-B1-U1	15E10-B1-L1
15E10-B4	15E10-B1-U1	15E10-B4-L1
15E10-L1/L2	15E10-L1-U1	15E10-L1-L1

恢复 PCR 循环:

1- 94°C, 2 分钟

2- 94°C, 45 秒

3- 60°C, 30 秒

4- 72°C, 2 分钟

5- 72°C, 4 分钟

步骤 2-4 重复 25 次。

使用 Qiagen 的 MinElute PCR 纯化试剂盒, 按照生产商的说明, 纯化恢复 PCR 产物。

5.2.2 限制性消化

如 4.2.1 所述, 用 Hind III-Spe I 消化人源化 15E10 V_H 构建物 A1、A4、B1, 用 Hind-III-BsiW I 消化两个人源化 15E10 V_L。

5.2.3 凝胶纯化

如 4.2.2 纯化限制性消化的产物。

5.2.4 连接

将 Hind III-Spe I 消化的 15E10 人源化 V_H 片段连接至 Hind III-Spe I 消化的 Rld hCy1wt 载体中。

将 Hind III-BsiW I 消化的 15E10 人源化 V_L 片段连接至 Hind III-BsiW I 消化的 Rln hCk 载体中。

使用 Promega 的 LigaFast 快速 DNA 连接系统, 按照生产商的说明

明进行连接。

5.2.5 转化

如 4.2.5 所述。

5.2.6 测序

将各个反应平板的菌落在补加 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 5 ml LB 培养基中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。

使用 Qiagen 的 QIAprep Spin Miniprep Kit, 按照生产商的说明, 提取和纯化质粒, 并使用如 4.2.5 所述的引物测序。

鉴别具有正确的人源化 V_{H} 和 V_{L} 序列的克隆, 并制备用于在 CHO 细胞中表达的质粒。

6. 人源化抗体在 CHO 细胞中的表达

在 R1d hC γ 1wt 和 R1n hC κ 哺乳动物表达载体中制备 4 个人源化 V_{H} 构建物(A1、A4、B1 和 B4)和 2 个人源化 V_{L} 构建物(L1 和 L2)。将 8 种质粒重链-轻链组合(A1L1、A1L2、A4L2、B1L2、B4L1 和 B4L2)瞬时共转染入 CHO 细胞中, 并以小规模表达, 获得 8 个不同的人源化抗体。以 gp130 抑制 ELISA 分析在上清液中产生的抗体(参见下文)。

6.1 质粒纯化

将含第 6 节的质粒之一的 DH5 α 细胞在 5 ml 补加 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基中于振荡培养箱内 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8 小时。

用 1 ml 8 小时工作日培养物接种补加 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 200 ml LB 培养基, 并在振荡培养箱中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜温育。

使用 Qiagen 的 QIAfilter Plasmid Maxi Kit, 按照生产商的说明, 提取和纯化质粒。将乙醇沉淀重悬浮在 200 μl TE 缓冲液中, 并在 100 倍稀释母液后以 260 nm 的吸光度测量质粒浓度。

6.2 转染

用 10^6 CHO 细胞接种 Corning Costar 3506 6-孔板的 9 个孔，并在补加超低胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的含 Glutamax-1 的 Dulbecco MEM (DMEM)培养基中于 37℃ 过夜培养。

对于每个孔，在涡旋下加入在 5 ml Bijou 中的以下物质：

1 ml 含 Glutamax-1 的 Optimem 1

5 μ g 携带人源化 V_H 的质粒

5 μ g 携带人源化 V_L 的质粒

30 μ g TransFast 转染试剂

以使每个转染都包含不同的轻链和重链组合。于室温进行 10-15 分钟温育。由孔中取出 DMEM 培养基，然后涡旋混合该混合物，并加入到合适的孔中。

温育于 37℃ 进行 1 小时。

每孔加入 2 ml Optimem，并于 37℃ 温育 48-72 小时。

6.3 分析人源化抗体

由每个孔回收培养基，并在 Eppendorf 5415R 台式离心机上以 13000 rpm 离心 1 分钟，将上清液通过 0.2 μ m Pall Acrodisc 25 mm 针头式过滤器。

以 gp130 抑制 ELISA 分析 8 个人源化抗体(4 个基于组 A 人构架，4 个基于组 B 人构架)和 15E10 嵌合抗体中和 hOSM 和 cOSM 二者的效力(参见图 4)。

表 2: 在 gp130 抑制 ELISA 中人源化抗体 B1L1、B1L2、B4L1 和 B4L2 的 IC50 值

	人 OSM	猕猴 OSM
B1L1	NA	NA
B1L2	0.334	0.110
B4L1	NA	0.167
B4L2	0.048	0.040
15E10 嵌合抗体	0.070	0.060

IC50 值以 $\mu\text{g/ml}$ 表示

NA: 抑制低于 50%

在 gp130 抑制 ELISA 中，表达的人源化抗体中的回复突变水平对与人和猕猴 OSM 的亲合力有直接影响。最少回复突变的抗体(B1L1)对猕猴 OSM 的亲合力不可检测，对人 OSM 的亲合力仅在背景以上。另一方面，最多回复突变的抗体(B4L2)对人和猕猴 OSM 的亲合力至少与嵌合 15E10 抗体相同。含回复突变轻链的 2 个人源化抗体具有的亲合力高于 2 个含直接嫁接轻链的人源化抗体。

基于人组 A 构架的 4 个人源化抗体没有一个在 gp130 ELISA 实验中产生抑制性信号。实际上，这些抗体没有一个可在 ELISA 中被检测出人 IgG1 全抗体(其中捕获抗体为在山羊中针对人 γ 重链产生的多克隆抗体，而检测抗体为在山羊中针对人 κ 轻链产生的多克隆抗体)。

在人 IgG 重链特异性 ELISA 和轻链特异性 ELISA 中进一步分析含这 4 种抗体的上清液，两个实验都产生阳性信号。两个 ELISA 都使用在山羊中针对人 IgG 重链和轻链产生的捕获抗体，而对于重链特异性 ELISA，检测抗体针对人 IgG γ 链产生，对于轻链特异性 ELISA，检测抗体针对人 IgG κ 链产生。

这些结果提示，其中重链由组 A 人构架设计的人源化抗体同时表达重链和轻链，但两条链不组合产生可变抗体。

基于人组 B 构架构建的最多回复突变的 V_H 构建物(B4)与回复突变的轻链(L2)组合, 被证明是最有效的人源化抗体。生产、纯化并分析含组 B V_H 的 3 种人源化抗体(B2L2、B3L2 和 B4L2), 以确定最适于候选物选择的人源化抗体。

6.4: 制备 6.3 的人源化 V_H 构建物

如 5.2.1 至 5.2.6 所述制备 2 种人源化构建物 B2 和 B3。

6.5 人源化抗体在 CHO 细胞中的表达

将 3 种含人源化 V_H 的质粒(B2、B3 和 B4)与第 6 节的含最多回复突变的人源化 V_L 的质粒(L2)的组合瞬时共转染入 CHO 细胞中并表达。通过在 rProtein A Sepharose 上的亲和层析由细胞培养上清液纯化所产生的 3 种人源化抗体, 并使用 15E10 嵌合抗体作为参比在 gp130 抑制 ELISA 和 KB 细胞实验中评价其对 OSM 的亲合力。

如 4.3.1 所述进行质粒纯化。如 4.3.2 所述进行转染。如 4.3.3 所述进行人源化抗体的纯化。

6.6 分析 6.5 节的人源化抗体

在 gp130 抑制 ELISA 和 KB 细胞实验(参见下文)中分析 6.5 节的纯化的人源化抗体中和人和猕猴 OSM 二者的效力。实验用各种来源的人 OSM 进行, 包括 CHO 产生的人 OSM、CHO 产生的人 OSM+25% 人 AB 血清、RA 患者的嗜中性粒细胞和滑液。

gp130 抑制 ELISA: 实验数据示于图 5-10。

KB 细胞实验: 实验数据示于图 11-16。

这些结果表明, 人源化抗体(B3L2 和 B4L2)所具有的效力等同于 15E10 嵌合抗体, 但高于人源化抗体 B2L2。这表明, 人源化策略(尤其是回复突变的选择)获得完全恢复抗原亲和力。

B4 V_H链的氨基酸序列为:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
GSTDYNAAFMSRLTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
VWGRGTLVTVSS (SEQ.I.D.NO: 21)

V_L链为 SEQ. I.D. NO: 12。

含 SEQ. I.D. NO: 21 的 V_H链和 SEQ. I.D. NO: 12 的 V_L链的治疗性抗体或其抗原结合片段可被认为是本发明的竞争性抗体，因此构成本发明的实施方案。

6.7 B3L2 人源化抗体与嵌合抗体和亲代鼠抗体的对比

使用人和猕猴 OSM 作为靶抗原在 gp130 抑制性实验和 KB 细胞实验(参见下文)中对比人源化抗体 B3L2 与 15E10 嵌合和亲代鼠抗体。设计在重链恒定区中具有 2 个点突变的人源化 B3L2 抗体(Ala 取代 235 位的 Leu 和 237 位的 Gly)，在 CHO 细胞中表达并纯化。突变降低了抗体实施效应子功能(尤其是补体因子募集)的能力。具有完整重链的人源化抗体候选物 B3L2 被称为 B3L2 wt (野生型)，而突变型 B3L2 抗体在图 17-19 中称为 B3L2 mut。

表 4: 在 gp130 抑制 ELISA 和 KB 细胞实验中人源化 B3L2 野生型与亲代鼠抗体和嵌合抗体的 IC₅₀ 值对比

	gp130 ELISA	KB 细胞实验
鼠 15E10	0.009	0.053
嵌合 15E10	0.019	0.079
B3L2 wt	0.035	0.123

IC₅₀ 值以 μg/ml 计

这些结果证实，人源化 B3L2 抗体具有等同于亲代鼠抗体 15E10 的效力。

人源化 B3L2 重链的氨基酸序列陈述于 SEQ. I.D. NO: 11，人源化 B3L2 轻链的氨基酸序列陈述于 SEQ. I.D. NO: 12。

实施例 7 - 抗体 10D3

7.1. 单克隆抗体的产生

如以上实施例 1 的详述产生杂交瘤 10D3。

7.2. 克隆 10D3 可变区的克隆

由克隆 10D3 杂交瘤细胞提取总 RNA，使用鼠前导序列特异性引物和预定同种型(IgG1/κ)的抗体恒定区，通过逆转录产生重链和轻链可变结构域的 cDNA。然后将重链和轻链可变结构域的 cDNA 克隆入载体 pCR2.1 中进行测序。

7.2.1 RNA 提取

使用 Promega 的 SV 总 RNA 分离系统，按照生产商的说明，由杂交瘤克隆 10D3 的 10^6 细胞的沉淀中提取总 RNA。

7.2.2 逆转录

使用对鼠前导序列和鼠 IgGγ2a/κ 恒定区特异性的引物逆转录 RNA，以产生重链和轻链可变结构域的 cDNA。所使用引物的混合物陈述于 Jones ST 和 Bendig MM Bio/technology 9: 88-89 (1991)。

制备 50 μM 的鼠 V_H 和 V_L 前导序列正向引物的混合物。另制备 50 μM 的鼠 γ2a 和 κ 恒定区反向引物的溶液。

7.2.3 逆转录 PCR (RT-PCR)

使用 Promega 的 Access RT-PCR 系统，按照生产商的说明，以双份进行编码重链和轻链可变区的 RNA 的逆转录。 V_H 和 V_L 正向和反向引物如上所述。

7.3. 7.2.3 的 PCR 产物的克隆

7.3.1 凝胶纯化

将 RT-PCR 产物($2 \times V_H$ 和 $2 \times V_L$)的凝胶上样液上至含 0.01%溴化乙锭的制备型 1%琼脂糖凝胶中,并在 TAE 缓冲液中以 100 V 电泳 1 小时,切下 V 区条带。另将 100 bp 的 DNA 梯在凝胶上电泳,以允许鉴别 V_H 和 V_L 条带。

使用 Qiagen 的 QIAquick™凝胶提取试剂盒,按照生产商的说明,由凝胶提取和纯化 DNA 片段。

7.3.2 连接

使用 Invitrogen 的 TA 克隆试剂盒,按照生产商的说明,将纯化的 RT-PCR 片段($2 \times V_H$ 和 $2 \times V_L$)克隆入 pCR2.1 载体中。

7.3.3 转化

按照 TA 克隆试剂盒说明将连接的质粒转化入 TOP10F'细胞中。将 50 μ l 和 200 μ l 的转化细胞涂布在含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 L-琼脂平板上,并用 8 μ l 500 mM IPTG 溶液和 16 μ l 50 mg/ml X-Gal 的 DMF 溶液覆盖。于 37°C 过夜温育平板。

7.3.4 测序

在 5 ml 补加 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中于 37°C 过夜培养 5 个白色菌落。

使用 Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit,按照生产商的说明,提取和纯化含 10D3 V_H 和 V_L 结构域的 pCR2.1 质粒。

使用引物 T7、M13 for 和 M13 rev 对 V_H 和 V_L 结构域测序。

10D3 V_H 结构域氨基酸序列(2 个 RT-PCR 反应的 10 个克隆的共有序列): SEQ. I.D. NO: 46

10D3 V_L 结构域氨基酸序列(2 个 RT-PCR 反应的 10 个克隆的共有序列): SEQ. I.D. NO: 47

7.4. 嵌合抗体

设计由嫁接在人 IgG1/ κ 野生型 C 区上的 7.3.4 的亲代鼠 V 区组成的嵌合抗体，以证实正确的鼠 V 区克隆，在测试人源化构建物时，该嵌合抗体又用作参比。嵌合抗体在 CHO 细胞中表达，纯化嵌合抗体，并在 gp130 抑制 ELISA 和 KB 细胞实验中测试其对 OSM 位点 II 的亲合力。

通过 PCR 扩增克隆的鼠 V 区，以引入克隆入哺乳动物表达载体 Rld 和 Rln 所需的限制性位点。设计 Hind III 和 Spe I 位点用于框定 V_H 结构域，并允许克隆入含人 $\gamma 1$ 野生型 C 区的改良 Rld 载体中。设计 Hind III 和 BsiW I 位点用于框定 V_L 结构域，并允许克隆入含人 κ C 区的改良 Rln 载体中。

7.4.1 PCR 扩增

V_H 正向引物:

Hind III 限制性位点加下划线，Kozak 序列为粗体。

V_H 正向引物: 5'-GAT **GAA GCT TGC CAC CAT** GGG ATG GAG CTG GGT CTT T-3' (SEQ. I.D. NO: 58)

V_H 反向引物: 5'-GAT GGA CTA GTG TGC CTT GGC CCC AAT A-3' (SEQ. I.D. NO: 65)

Spe I 限制性位点加下划线。

V_L 正向引物:

V_L 正向引物: 5'-GAT **GAA GCT TGC CAC CAT** GGA TTT ACA GGT GCA GAT T-3' (SEQ. I.D. NO: 59)

Hind III 限制性位点加下划线，Kozak 序列为粗体。

V_L 反向引物: 5'-GAT GCG TAC GTT TCA GCT CCA GCT TGG TCC C-3' (SEQ. I.D. NO: 60)

BsiW I 限制性位点加下划线

PCR 反应:	水	66 μ l
	10 \times PCR 缓冲液	10 μ l
	dNTP (2 mM)	10 μ l
	引物 1 (5 μ M)	4 μ l
	引物 2 (5 μ M)	4 μ l
	AmpliTaq 聚合酶	2 μ l
	纯化的质粒	4 μ l
	总体积	100 μ l

引物 1: V_H 或 V_L 正向引物

引物 2: V_H 或 V_L 反向引物

纯化的质粒: 通过 Qiagen Minipreps (稀释 200X) 纯化的 pCR2.1 V_H 或 V_L 质粒

PCR 循环:	1- 95 $^{\circ}$ C, 4 分钟
	2- 95 $^{\circ}$ C, 1 分钟
	3- 55 $^{\circ}$ C, 1 分钟
	5- 72 $^{\circ}$ C, 7 分钟

步骤 2-4: 重复 30 次

7.4.2 克隆入哺乳动物表达载体

使用 Qiagen 的 MinElute PCR 纯化试剂盒, 按照生产商的说明, 纯化 PCR 产物。

7.4.2.1 限制性消化

用 Hind III-Spe I 消化 V_H PCR 产物和 Rld hC γ 1wt 哺乳动物表达载体:

10 \times 缓冲液(NEBuffer2)	5 μ l
BSA 100x (NEB)	0.5 μ l
DNA	5 μ l

Hind III (Promega)	2 μ l
Spe I (NEB)	2 μ l
水	35.5 μ l
总体积	50 μ l

DNA: 纯化的 V_H PCR 产物或 Rld hCylwt 载体(以 0.25 mg/ml)于 37°C 温育 2 小时。

用 Hind III-BsiW I 消化 V_L PCR 产物和 Rln hCk 哺乳动物表达载体:

10×缓冲液(NEBuffer2)	5 μ l
DNA	5 μ l
Hind III (Promega)	2 μ l
水	38 μ l
总体积	50 μ l

DNA: 纯化的 V_L PCR 产物或 Rln hCk 载体(以 0.25 mg/ml)于 37°C 温育 2 小时。

加入 2 μ l BsiW I (NEB), 并于 55°C 温育 2 小时。

7.4.2.2 凝胶纯化

将限制性消化产物的凝胶上样液上至含 0.01% 溴化乙锭的制备型 1% 琼脂糖凝胶中, 并在 TAE 缓冲液中以 100 V 电泳 1 小时, 切下 Rld 和 Rln 载体以及 V_H 和 V_L PCR 片段条带。另将 100 bp 的 DNA 梯在凝胶上电泳, 以允许鉴别 V_H、V_L 和载体条带。

使用 Qiagen 的 QIAquick 凝胶提取试剂盒, 按照生产商的说明, 由凝胶提取和纯化 DNA。

7.4.2.3 连接

将 Hind III-Spe I 消化的 V_H PCR 片段连接至 Hind III-Spe I 消化的 Rld hCylwt 载体中。

将 Hind III-BsiW I 消化的 V_L PCR 片段连接至 Hind III-BsiW I 消化的 Rln hCk 载体中。

使用 Promega 的 LigaFast 快速 DNA 连接系统，按照生产商的说明进行连接，获得：

- V_H : 载体：Hind III-Spe I 消化的 Rld hC γ 1wt
 插入片段：Hind III-Spe I 消化的 V_H PCR 片段
- V_L : 载体：Hind III-BsiW I 消化的 Rln hCk
 插入片段：Hind III-BsiW I 消化的 V_L PCR 片段

7.4.2.4 转化

将连接的产物转化入 DH5 α 感受态细胞中：

在冰上融解 200 μ l DH5 α 小瓶。

在转化管中制备 50 μ l 等份。

加入 2 μ l 连接混合物，并用吸管尖端轻轻混合，接着在冰上温育 30 分钟。

在未振荡的情况下将混合物于 42 $^{\circ}$ C 温育 45 秒。

然后将其转移入冰中达 2 分钟。

加入 450 μ l SOC 培养基，将管在振荡培养箱上于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。

将 100 μ l 培养物涂布在补加 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 L-琼脂平板上，并于 37 $^{\circ}$ C 过夜温育。

7.4.2.5 测序

在 5 ml 补加 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养 V_H 和 V_L 克隆。

使用 Qiagen 的 QIAprep Spin Miniprep Kit，按照生产商的说明，提取和纯化分别含 V_H 和 V_L 结构域的 Rld 和 Rln 质粒。

使用在 Rld 载体和信号序列中的正向引物以及在人 C γ 1 区中的

反向引物对 V_H 区测序。

使用在 Rln 载体中的正向引物和信号序列以及在人 C κ 区中的反向引物对 V_L 区测序。

鉴别具有正确的 V_H 和 V_L 序列的克隆，并制备用于在 CHO 细胞中表达的质粒。

7.4.3 嵌合抗体在 CHO 细胞中的表达

将分别含 10D3 V_H 和 V_L 结构域的 Rld 和 Rln 质粒瞬时共转染入 CHO 细胞中并表达。通过在重组 A 蛋白 Sepharose 上的亲和层析由细胞培养上清液纯化产生的嵌合抗体，并在 gp130 抑制 ELISA 和 KB 细胞实验(参见下文)中评价其对 OSM 的亲合力。

7.4.3.1 质粒纯化

将含 Rld-10D3 V_H 和 Rln-10D3 V_L 质粒的 DH5 α 细胞在 5 ml 补加 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中于振荡培养箱内 37 $^{\circ}$ C 培养 8 小时。

用 1 ml 8 小时工作日培养物接种 200 ml 补加 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基，并在振荡培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 过夜温育。

使用 Qiagen 的 QIAfilter Plasmid Maxi Kit，按照生产商的说明，提取和纯化质粒。将乙醇沉淀重悬浮在 200 μ l TE 缓冲液中，并在 100 倍稀释母液后以 260 nm 的吸光度测量质粒浓度。

7.4.3.2 转染

在 4 \times 175 cm² BD Falcon 组织培养瓶中，在补加超低胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的含 Glutamax-1 的 Dulbecco MEM (DMEM)培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养 CHO 细胞至铺满。

对于每个瓶，在 50 ml Falcon 管中，在涡旋下加入以下物质并混合：

8 ml 含 Glutamax-1 的 Optimem 1

20 μg Rld-10D3V_H 纯化质粒

20 μg Rln-10D3V_L 纯化质粒

240 μl TransFast 转染试剂，

将混合物于室温(RT)温育 10-15 分钟。

去除瓶中的 DMEM 培养基，然后涡旋混合该混合物，并加入到瓶中。

将混合物于 37°C 温育 1 小时。

向瓶中加入 32 ml Optimem，并于 37°C 温育 48-72 小时。

7.4.3.3 嵌合抗体的纯化

合并所有 175 cm² 瓶的培养基，并在 MSE Mistral 2000 上以 1500 rpm 离心 3 分钟，上清液通过 500 mL 的 Filter System 0.22 μm CA。

在使用 Unicorn 软件的 Amersham Biosciences Akta Explorer 上由澄清的上清液纯化抗体。

使用的柱为 1 ml HiTrap rProtein A Sepharose FF。

流速为 1 ml/分钟。

柱子用 10 CV Dulbecco PBS 平衡，然后通过泵 A 加载澄清上清液。

用 20 CV Dulbecco PBS 流洗柱，将泵 A 流洗至无上清液，再使 10 CV Dulbecco PBS 通过柱，以确保上清液被完全清除。

用 10 CV ImmunoPure IgG 洗脱缓冲液(Pierce)洗脱抗体，并以含 100 μl 1 M Trizma-HCl pH 8.0 中和缓冲液的 1 ml 级分进行收集。

用 5 CV Dulbecco PBS 再平衡柱。

通过于 280 nm 读取相对于空白溶液的吸光度，定量洗脱级分中的抗体，空白溶液含 10 体积 ImmunoPure IgG 洗脱缓冲液+1 体积 1 M Trizma-HCl pH 8.0，合并具有足量纯抗体的级分，并以 100 μl 等份储存于 -20°C。

7.4.4 嵌合抗体的分析

在 gp130 抑制 ELISA 和 KB 细胞实验(参见下文)中分析 10D3 嵌合抗体中和人和猕猴 OSM 二者的效力。下文陈述了 gp130 抑制 ELISA 和 KB 细胞实验的方法。

在 gp130 抑制 ELISA 和 KB 细胞实验中, 10D3 嵌合抗体中和 OSM。这些结果证实, 已成功地克隆了正确的可变区, 产生能够结合人和猕猴 OSM 位点 II 二者的抗原结合嵌合抗体。现在可人源化 10D3 重链和轻链可变结构域。

克隆鼠可变区并对其测序, 然后嫁接在人 γ 1/ κ 恒定区上, 以产生嵌合抗体。嵌合 10D3 抗体在 gp130 ELISA 和 KB 细胞实验(参见下文)中显示出的抗人和猕猴 OSM 的效力等同于亲代鼠抗体。

使用“最佳匹配”策略将鼠抗体人源化。对于可变重链结构域, 选择具有 65%同一性的序列, 将鼠 CDR 嫁接在人构架上。设计大量在构架中具有各种回复突变以恢复亲和力的构建物。这些构建物是:

构建物	回复突变
A	T28I
B	T28I、R71V、T73K
C	T28I、V67A、M69L、R71V、T73K
D	T28I、M48I、G44K、V67A、M69L、R71V、T73K

对于可变轻链结构域, 选择具有 60.0%同一性的序列, 将鼠 CDR 嫁接在人构架上。设计大量在构架中具有各种回复突变以恢复亲和力的构建物。这些构建物是:

构建物	回复突变
LA	无(直接嫁接)
LB	L46R、L47W
LC	Y36F、Q38K
LD	Y36F、Q38K、L46R、L47W
LE	Y36F、Q38K、L46R、L47W、F71Y

通过构建重叠寡核苷酸仅合成具有最少和最多回复突变的构建物(A、D、LA、LE)。在 CHO 细胞中小规模表达 4 种人源化抗体组合(ALA、ALE、DLA、DLE)，在 gp130 ELISA 中分析上清液的抗体亲和力。

仅人源化抗体 ALE 和 DLE 在 gp130 ELISA 中显示出抑制，但 ALE 由于在上清液中的抗体浓度低而抑制不足，所以选择 DLE。在 CHO 细胞中放大生产人源化抗体 DLE，纯化抗体，并使用 10D3 嵌合抗体作为对照在 gp130 ELISA 和 KB 细胞实验中分析抗体。

IC50 值(gp130 ELISA)($\mu\text{g/ml}$):

	hOSM	cOSM
嵌合抗体	0.032	0.246
DLE	0.021	0.059

在 gp130 ELISA 中，人源化抗体 10D3 DLE 抗人 OSM 和猕猴 OSM 的效力即便未超过嵌合抗体，至少也等效。

在 KB 细胞实验中分析人源化 10D3 DLE 和 10D3 嵌合抗体。10D3 DLE 获得 0.205 $\mu\text{g/ml}$ 的抗人 OSM IC50 值和 0.07 $\mu\text{g/ml}$ 的抗猕猴 OSM IC50 值。

总之，已成功地将抗人 OSM 位点 II 的抗体 10D3 人源化，其显示的效力等同于亲代鼠抗体。

材料

SV 总 RNA 分离系统: Promega Z3100

Access RT-PCR 系统: Promega A1250

QIAquick 凝胶提取试剂盒: Qiagen 28704

凝胶上样液: Sigma G7654

琼脂糖: invitrogen 15510-019

溴化乙锭: Sigma E1510

TAE 缓冲液: 自制

100bp DNA 梯: New England BioLabs N3231S
TA 克隆试剂盒: Invitrogen 45-0046
TOP10F' 细胞: Invitrogen 44-0300
L-琼脂+100 µg/ml 氨苄青霉素: 自制
X-Gal, 50 mg/ml 的 DMF 溶液: Promega V394A
AmpliTaq DNA 聚合酶: Applied Biosystems
10x PCR 缓冲液: Applied Biosystems
E-Gel 1.2%琼脂糖: Invitrogen G501801
LB 培养基+100 µg/ml 氨苄青霉素: 自制
QIAprep Spin Miniprep Kit: Qiagen 27106
MinElute PCR 纯化试剂盒: Qiagen 28004
NEBuffer2 10x 浓缩液: New England Biolabs B7002S
纯化的 BSA 100x 浓缩液: New England Biolabs B9001S
BsiW I: New England Biolabs R0553L
Hind III: Promega R604A
Spe I: New England Biolabs R0133S
LigaFast Rapid DNA 连接系统: Promega M8225
MAX Efficiency DH5 α 化学感受态细胞: Invitrogen 18258-012
SOC 培养基: 自制
QIAfilter Plasmid Maxi Kit: Qiagen 12263
含 Glutamax-1 的 Dulbecco MEM: Invitrogen 31966-021
含 Glutamax-1 的 Optimem 1: Invitrogen 51985-026
TransFast 转染试剂: Promega E2431
1 ml HiTrap 重组 A 蛋白 Sepharose FF: Amersham Biosciences
17-5079-01
Dulbecco PBS: Sigma D8537
ImmunoPure IgG 洗脱缓冲液: Pierce 21009
1 M Trizma-HCl pH 8.0: Sigma T2694

ProofStart DNA 聚合酶: Qiagen 1016816

ProofStart PCR 缓冲液: Qiagen 1016961

实施例 8. gp130 抑制 ELISA

OSM 依序结合 gp130 以及 OSM 受体或 LIF 受体的任一种。在此描述的实验允许测量结合 ELISA 板上的 gp130 的 OSM (例如 hOSM)。另外,该实验允许测量抗 OSM 位点 II 的抗体对 OSM 与 gp130 受体结合的抑制。

8.1 材料

1. Nunc Immunoplate 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. 人 gp130-Fc 100 $\mu\text{g/ml}$ (R&D Systems, 671-GP-100)
3. PBS
4. BSA (Sigma A7030)
5. 人重组 OSM 10 $\mu\text{g/ml}$ (R&D Systems, 非糖基化)
6. 生物素化抗人 OSM 50 $\mu\text{g/ml}$ (R&D Systems, BAF295)
7. 链霉抗生物素蛋白 HRP (Amersham RPN4401)
8. 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)(Sigma)
9. 硫酸
10. Tween 20 (Sigma P7949)

8.2 试剂的制备

1. 板的制备: 用 PBS 稀释人 gp130-Fc 至 1 $\mu\text{g/ml}$, 以 50 $\mu\text{l/孔}$ 加入, 覆盖并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜温育。
2. 漂洗缓冲液: 向 1 L PBS 中加入 500 μl Tween 20 (0.05%)
3. 阻断缓冲液: 向 500 ml PBS 中加入 5 g BSA (1%)

8.3 方法

1. 使用标准洗板方法漂洗板并拍干。
2. 加入 200 μl /孔的阻断缓冲液，并于室温温育 1 小时。
3. 如步骤 1 漂洗。
4. 加入 50 μl /孔 OSM 标准品或样品。覆盖并于室温搅拌 2 小时。
(根据样品，用阻断缓冲液或组织培养基将 OSM 稀释至 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.563 和 0 ng/ml)
5. 如步骤 1 漂洗。
6. 加入 50 μl /孔以阻断缓冲液稀释至 30 ng/ml 的生物素化抗人 OSM。覆盖并于室温搅拌 1 小时。
7. 如步骤 1 漂洗。
8. 加入 50 μl /孔以阻断缓冲液稀释至 1/4000 的链霉抗生物素蛋白 HRP。覆盖并于室温搅拌 30 分钟。
9. 如步骤 1 漂洗。
10. 加入 100 μl /孔的 TMB 底物。覆盖并于室温搅拌 30 分钟。
11. 加入 50 μl /孔的 1 M H_2SO_4 。
12. 读取 450_{nm} 的 OD。

8.4 用于分析抗体介导的 gp130-OSM 结合抑制的实验的应用

- 1)将 25 ng/ml OSM 与各种浓度的抗-OSM 抗体或各种稀释度的含 OSM 抗体的抗血清混合。于室温温育 1 小时。
- 2)向如上制备的含结合的 gp130 的 96 孔板加入 50 μl /孔的抗体-OSM 混合物。
- 3)继续进行如上所述的实验。

9. KB 实验

引言

KB 细胞(一种人上皮细胞系)表达 gp130 连同 LIF 和 OSM 受体

的 mRNA (Mosley, J. Biol Chem., 271 (50) 32635-32643)。OSM 和 LIF 二者皆诱导 KB 细胞释放 IL-6。该细胞系已用于鉴别调节 OSM 与 gp130 之间相互作用的单克隆抗体。

9.1 方法

KB 细胞得自 ECACC (保藏号 94050408), 并保持在补加谷氨酰胺的 DMEM+10%热失活 FCS (“KB 培养基”)中。细胞以单层生长, 每周分瓶两次。使用 Sigma 非酶性细胞解离培养基或 Versene 分离细胞。

1. 加入 2×10^4 细胞/100 μ l/孔/96 孔板, 并过夜温育(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)。
2. 制备在培养基中的 OSM 标准品。
3. 制备 1 ng/ml OSM+抗体/血清稀释液。于室温温育 1 小时。
4. 小心地去除 KB 细胞板的培养基, 加入 OSM 标准品和 OSM-抗体混合物。
5. 于 37 $^{\circ}$ C 温育约 16-18 小时。
6. 去除培养基并分析 IL-6。

注意:

- 培养基可保持冷冻, 直至准备开始分析。
- 培养基应稀释约 20 倍用于实验。
- 在筛选杂交瘤时, 克隆培养基与 KB 培养基的比率应恒定, OSM 标准品应在此混合物中制备。
- 用约 100 ng/ml OSM 刺激 KB 细胞产生最大的 IL-6 产量, 但 1 ng/ml 足以观察到抗体中和活性。

10. 竞争性实验

该实验允许测量特异性结合 hOSM 位点 II 的候选非人抗体对具有 SEQ. I.D. NO: 11 的重链和 SEQ. I.D. NO: 12 的轻链的人源化抗体

(对于本实施例,以 15E10-B3L2 代表)与可溶性糖基化 hOSM 的结合的抑制。该实施例实验的示意图示于图 20。

用抗位点 III 的单克隆抗体(在本文称为 OM4-11.31)包被板。

对于标准曲线: 将由 1 $\mu\text{g/ml}$ 开始连续稀释的 15E10-B3L2 纯化的标准品与 50 ng/ml 的可溶性糖基化人 OSM 温育。抗体通过位点 II 结合 OSM, 然后通过抗位点 III 的一抗将复合物捕获在板上。

对于竞争性实验: 将由 1 $\mu\text{g/ml}$ 开始连续稀释的候选抗体与 50 ng/ml 的可溶性糖基化人 OSM 和 150 ng/ml 的 15E10-B3L2 温育。

通过抗人 γ 链二抗检测复合 15E10-B3L2 的存在。

方法:

1/包被

用 4 $\mu\text{g/ml}$ 抗人 OSM 位点 III 抗体(OM4-11.31, 自制)的 PBS 溶液以 50 μl /孔包被 Nunc Maxisorp Immunoplate。将板于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜温育。

2/阻断

用 PBS+0.05% Tween (PBST)漂洗板 3 次。向每孔中加入 100 μl 1% BSA (Sigma A7030)的 PBS 溶液。在振荡下将板于室温温育 2 小时。

3/预温育

15E10B3L2 标准品:

制备 1 $\mu\text{g/ml}$ 15E10-B3L2 抗体在 50 ng/ml 人 OSM 的阻断缓冲液中的溶液, 并将 67 μl 加入到非吸附性 96 孔板 A 行的两个孔中。用 50 μl 的 50 ng/ml 人 OSM 的阻断缓冲液连续稀释 B-G 行的抗体。

竞争性抗体:

制备 1 $\mu\text{g/ml}$ 竞争性抗体在 150 ng/ml 15E10-B3L2+50 ng/ml hOSM 的阻断缓冲液中的溶液, 并将 100 μl 加入到非吸附性 96 孔板 A 行的两个孔中。用 50 μl 的 150 ng/ml 15E10-B3L2+50 ng/ml 人 OSM 的阻断缓冲液连续稀释 B-G 行的抗体。将两个孔与无竞争性抗体的

稀释液温育。

预温育板在静态条件下于室温温育 1 小时。

4/温育

用 PBST 漂洗包被板 3 次。

将 45 μl 的各种标准品和样品由预温育板转移至包被板上的相同孔中。向空白孔中加入 PBS。

在振荡下将板于室温温育 2 小时。

5/二抗

用 PBST 漂洗板 3 次。

向每孔中加入用阻断缓冲液稀释 2000 倍的 50 μl 山羊抗人 γ 链-过氧化物酶(Sigma A6029)。

在振荡下将板于室温温育 1 小时。

6/底物

用 PBST 漂洗板 3 次。

按照生产商的说明制备 OPD 底物(Sigma P9187)的水溶液。

向每孔中加入 50 μl 。

板于室温温育。

7/终止

一旦已充分出现显色，则通过加入 10 μl 3 M H_2SO_4 /孔终止产色反应。

使用空白孔作为 0 吸光度，用板读数器于 490 nm 对板读数。

绘出 490 nm 吸光度对 15E10 浓度的标准曲线。

由标准曲线读出含竞争性抗体的样品中复合的 15E10 的浓度。

如下计算抑制百分率：

$$100 - [(\text{样品中的 } 15\text{E}10 \text{ 浓度 ng/ml} \div 150 \text{ ng/ml}) \times 100]$$

绘制抑制百分率对竞争性抗体浓度的曲线，由曲线读出在等摩尔浓度竞争性抗体(150 ng/ml 竞争性抗体)下对 15E10 的抑制百分率。

实施例 10.1: 10D3 作为竞争性抗体

267 $\mu\text{g/ml}$ 的鼠 10D3 克隆 E9 抗体(母液)用作 15E10 的竞争剂。
10D3 具有以上表 A 列出的轻链和重链 CDR。

结果:

10D3 ($\mu\text{g/ml}$)	复合的 15E10 ($\mu\text{g/ml}$)	抑制百分率
1	0.019	87.3
0.5	0.029	80.7
0.25	0.044	70.7
0.125	0.062	58.7
0.062	0.092	38.7
0.031	0.132	12.0
0.016	0.146	2.7

等摩尔浓度(0.15 $\mu\text{g/ml}$)的 10D3 竞争剂对 15E10 的抑制百分率: 62.3%。参见图 21。

实施例 11 - 鉴别结合 OSM 并为 OSM 位点 II 或位点 III 特异性的抗体

就生物学功能而言, OSM 必须既与 gp130 相互作用, 又与 LIFR 或 OSMR β 相互作用。OSM 和 gp130 的初始相互作用涉及 OSM 位点 II, 而 OSM 与 OSMR β 或 LIFR 的相互作用经位点 III 发生。由此推断, 靶向位点 II 或位点 III OSM 序列的抗体或足够接近这些位点使得抗体结合能遮蔽这些位点的表位能中和 OSM 活性。

测量 OSM-gp130 结合的实验陈述于实施例 8。典型的标准曲线(于 1 $\mu\text{g/ml}$, gp130)示于图 22。

通过改变实验条件(至 4 $\mu\text{g/ml}$), 灵敏度可极大提升, 如图 22b 所示。

而且, 尽管以上数据使用非糖基化 OSM 产生, 但糖基化 OSM 在该实验中也结合 gp130。参见图 22c。

在该实验中使用可商购的中和抗 OSM 抗体(Mab 295, R&D Systems), 以观察其是否能阻断 OSM-gp130 相互作用。令人惊奇的是, 其增强 OSM 信号, 如图 23 所示。

当将 Mab 295(30 $\mu\text{g/ml}$)加入到 OSM 中时, 与 OSM 浓度 > 10 ng/ml 的单独的 OSM 相比, 其将由 ELISA 获得的 OD 读数大致加倍。如果将 gp130 由板中略除, 则 OSM+Mab295 产生的信号降低至本底值。本发明的发明人假定以下诠释: Mab295 并不结合或阻断 OSM 位点 II。在低 OSM 浓度时, MAB295 抗体分子仅结合一个 OSM, 但该 OSM 还自由结合 gp130, 因为位点 II 可用。在较高浓度时, 抗体分子结合两个 OSM 分子, 其中任一个都可用于结合 gp130, 因此得出可能有 2 个 OSM 的分子, 这 2 个 OSM 均结合 gp130 分子, 一个直接结合 gp130, 另一个由于抗体的双价特性而系连。预计任一个非位点 II 抗体都应具有该作用, 但因为 Mab 295 是中和抗体(参见图 24), 所以其一定结合或阻断 OSM 位点 III。因此, 应用实施例 8 的 gp130-OSM ELISA 实验和实施例 9 的 KB 细胞实验可鉴别出中和 OSM 抗体是位点 II 特异性的还是位点 III 特异性的。更具体地说, 位点 III 抗体在 KB 细胞实验中应中和 OSM, 但在 ELISA 实验中不中和 OSM-gp130 结合。位点 II 抗体在 ELISA 和 KB 实验中均中和 OSM。

gp130-OSM ELISA 实验用作初级杂交瘤筛选, 以检测在实施例 1 中产生的抑制 gp130-OSM 相互作用的抗体。另外, 还对杂交瘤进行筛选, 以检测 OSM 结合活性。用实施例 9 的 KB 细胞实验测试显示出高 OSM 结合但在实施例 8 的 ELISA 实验中不抑制 OSM-gp130 结合的杂交瘤上清液的 OSM 中和情况。这鉴别出许多位点 III 特异性 OSM 抗体。一个这样的抗体被称为 OM4-11.31。

当在 gp130-OSM ELISA 中使用位点 III OSM 特异性抗体时, 其极大地增强了 OSM 信号, 如图 25 所示。

位点 II 抗体 1B5 (1 $\mu\text{g/ml}$)完全抑制 OSM-gp130 结合。但是, 位点 III OSM 抗体 OM4-11.3.1 引起 OSM 结合的二阶段剂量依赖性增

强。在使用最高 OM4-11.3.1 浓度时，信号大约为单独的 OSM 信号的 2 倍，但随着抗体浓度降低，信号增强，直至达到峰值，信号增强推测是形成可结合 gp130 的抗体-OSM 复合物的结果。OM4-11.3.1 的同种型对照 IgG 对 OSM-gp130 结合没有作用。图 25 表明，该 ELISA 辨别位点 II 与非位点 II 特异性抗体的灵敏度高，因为前者抑制 OSM 结合，但后者增强 OSM 结合。

实施例 11.1 - 位点 II 和位点 III 特异性抗 OSM 抗体在 ELISA OSM-gp130 实验中的作用

当位点 II 和位点 III OSM 特异性抗体混合在一起时，位点 II 抗体在实施例 8 的 gp130-OSM ELISA 中具有显著作用，如图 26 所示。

位点 III 特异性 OSM 抗体 OM4-11.17 大大增强了单独的 OSM 信号。虽然该增强作用不受加入对照 IgG 影响，但加入位点 II 特异性 OSM 抗体 OM4-5.3 大大降低了信号。相信图 26 最右侧柱的少量可检测信号应归因于在加入至 gp130 板之前位点 II mAb 和位点 III-OSM 复合物的次佳温育时间。

gp130-OSM ELISA 允许监测在人 OSM 免疫小鼠抗血清中出现的位点 II 特异性 OSM 抗体(参见实施例 1)，如图 27a、27b 和 27c 所示。

在第一次加强后，主要产生非位点 II 抗体，但在第二次加强后开始出现位点 II 特异性抗体，在第三次加强后，明显观察到位点 II 抗体占优势，血清浓度更高。

实施例 11.2 - OSM 位点 II 和位点 III 特异性抗体对 OSM 中和的协同作用

因为 OSM 位点 II 和位点 III 是 OSM 功能所必需的，所以靶向两个位点的抗体的组合可在 OSM 中协同起作用。OSM 位点 III 不仅用于与 OSMR β 和 LIFR 相互作用，而且用于第二个 OSM 分子与

gp130 的结合，与抗位点 II 的那些抗体相比，这可能有助于增加位点 III 特异性抗体的效力。

图 28a 和 28b 图示了 KB 实验，其中，和任一种单独的抗体相比，位点 II 特异性抗体和位点 III 特异性抗体的组合大大增加了 OSM 中和的效力。

用于该组合的抗体的浓度示于下表。

[17H100]	[人 15E10]
ng/ml	ng/ml
20	120
7	40
2.2	13.3
0.7	4.4
0.3	1.5
0.082	0.5
0.027	0.165
0.0091	0.55

最有活性的位点 II 和位点 III 特异性抗体的对比表明，后者在 OSM 中和中更有效。但是，观察到位点 II 抗体和位点 III 抗体与其它种的 OSM 的交叉反应性是不同的，因为所有有效位点 II 抗体都中和猕猴 OSM (在 gp130-OSM ELISA 和 KB 细胞实验中)，而位点 III 抗体不能如此(仅在 KB 实验中中和猕猴 OSM)。

推测 OSM 与 gp130 以及与 OSMR β 或 LIFR 二者的相互作用的阻断是位点 II 抗体和位点 III 抗体在 OSM 中和中的协同作用的基础。但是，也有可能是抗体的结合有利于针对不同位点的另一种抗体的结合。

实施例 11.3 - 位点 II 和位点 III 特异性 OSM 抗体的组合中和 OSM 的优化

因为位点 II 和位点 III OSM 抗体的组合大大增强了中和效力，所以可基于不同抗体的结合亲和力设想用于开发最优浓度的策略。实施例 11.3 是理论性的。

首先，应使用等离子体共振技术测量位点 II 或位点 III 特异性抗体对先前分别由位点 III 或位点 II 特异性抗体结合的 OSM 的亲和力。如果结合常数(Kd)与单个抗体与 OSM 的结合显著不同，则在位点 II 和位点 III 抗体的结合中出现协同相互作用。

基于这些抗体结合研究的数据，可使用双倍稀释制备 10 倍 Kd 值至 1/10 Kd 值的位点 II 和位点 III 抗体浓度。另外，制备两种抗体的组合，以使各个浓度的位点 II 抗体与每个浓度的位点 III 抗体组合，使得可研究位点 II 或位点 III 抗体与 OSM 的相等结合，以及位点 II 和位点 III 抗体结合中的优势。用 KB 细胞实验测试所有抗体稀释度和组合的 OSM 中和。该实验的数据使得可选择在 OSM 中和中最有效的抗体组合。

实施例 12 - 抗位点 II OSM 特异性抗体抑制 OSM 刺激 RA 滑膜成纤维细胞的能力

先前，我们已表明，位点 II 和位点 III 特异性 OSM 抗体可抑制 OSM 刺激 KB 细胞。但是，这些细胞是上皮细胞、经过转化，不能代表存在于类风湿性滑膜中的细胞。因此，我们研究了位点 II 特异性 OSM 抗体抑制 OSM 刺激 RA 滑膜成纤维细胞的能力。

将成纤维细胞以 2×10^4 细胞/孔接种在 96 孔板中，并在含 10% FCS 的 DMEM 中培养，直至铺满，一周更换 3 次培养基。然后将培养基更换为新鲜培养基，该新鲜培养基或者不含 OSM，或者含 1 ng/ml OSM，或者含已与培养基中的各种浓度的抗 OSM 抗体预温育 1 小时的 1 ng/ml OSM。48 小时后，取出培养上清液，并储存在 -20°C ，直

至用 ELISA 分析 IL-6 浓度。

图 29 图示了 4 个 RA 滑膜成纤维细胞株的代表性数据。OSM 抗体引起对 OSM 刺激的 IL-6 分泌的完全抑制，尽管抗体效力在不同细胞株之间表现出些许差异。

实施例 13 – OSM 糖基化对抗 OSM 抗体中和效力的作用

使用先前描述的方法，由以非糖基化 OSM 免疫小鼠产生抗 OSM 抗体。筛选这些抗体导致鉴别出干扰 OSM gp130 结合的有效中和抗体(OM4-5.3)，如图 30 所示。

预计 OM5-5.3 应具有类似的抗糖基化 OSM (CHO 细胞糖基化) 的能力。但是，在测量该抗体的亚克隆(OM4-5.3.1)抑制糖基化 OSM (CHO 细胞糖基化的 hOSM)结合 gp130 的能力时，观察到效力显著丧失，如图 31a 所示。此外，在来源于非糖基化 OSM 免疫小鼠的其它位点 II 特异性抗体中，也观察到这种抗糖基化 OSM 的效力与非糖基化 OSM 相比丧失，如图 31b 所示。

而且，在 KB 细胞实验中，来源于非糖基化 OSM 免疫的位点 III 抗体也显示出抗糖基化 OSM 的效力是非糖基化 OSM 大约 1/10 倍——参见下表 1。

表 1

抗体	非糖基化 OSM	糖基化 OSM
	IC50 ng/ml	IC50 ng/ml
OM4-11.17	4.1	45.5
OM4-11.31	7.7	89.6

因为用非糖基化 OSM 免疫产生更有效抗非糖基化 OSM 而不是糖基化形式的抗体，所以我们认为用糖基化 OSM 免疫可产生抗该形式 OSM 的效力较高的抗体。实际结果就是如此。图 32a 和 32b 图示了 gp130-OSM ELISA 中来源于糖基化 OSM 免疫的两个位点 II 特异性 OSM 抗体(15E10 和 5H2)的抗糖基化和非糖基化 OSM 的活性。

实施例 14 - RA 患者中血清和滑液 OSM 水平之间的关联

RA 患者中 OSM 产生的主要部位之一位于关节炎关节中，因为在滑液中可检测到高 OSM 水平。相反，RA 患者的血清 OSM 水平非常低，只有随着以下实施例 16 公开的高灵敏度 ELISA 的开发才有可能精确地测量这些水平。我们通过测量 RA 患者匹配的滑液和血清样品，研究了关节炎关节和循环中 OSM 浓度之间的可能关联。

以下文陈述的 ELISA 实验(OM4-11.31 抗体捕获 OSM)测量的血清和滑液 OSM 水平示于下表，图 33 图示了两个测量结果之间的关联。在取样后冷冻样品，仅在这些测量前才融化。通过线性回归测定的这两个参数的相关系数为 0.9447。

患者	血清[OSM] pg/ml	SF [OSM] pg/ml
1	9.8	43.24
2	13.7	101.445
3	0	0
4	88.56	397
5	22.64	142.12
6	18	147.4
7	13	9.2
8	13.8	29.88
9	10.68	14.76
10	13.8	15.96

血清和 SF OSM 水平之间的良好相关性提示，关节炎关节以外的 OSM 生产部位对循环 OSM 水平的影响相对较少，或者这些部位以和在该关节中生产相关联的方式调节 OSM 生产。无论如何，本发명의发明人推测，这种相关性可允许由血清 OSM 测量结果预测关节 OSM 水平，并可用于剂量设定用于治疗 RA 患者的中和 OSM 抗体。

实施例 15 - OA 患者滑液(SF)和血清中 OSM 的测量

因为软骨降解是骨关节炎的特征，OSM (特别是与 IL-1 和其它细胞因子协同时)可诱导软骨分解，所以我们测量了 OA 患者滑液和血清中的 OSM 水平。

通过离心去除 SF 样品中的细胞。用 0.1 U/ml 透明质酸酶(Fluka, 53725)于室温处理上清液 1 小时，此后以 4000 rpm 对其离心 10 分钟。取出上清液，并分成等份，储存于-80℃，直至分析。

在示于图 34a 和 b 以及 35 的两个实验中，使用实施例 16 的 ELSIA 检测，分析 OA SF 中的 OSM 浓度。

尽管 46 个 OA SF 中有 13 个无可检测的 OSM，但许多含有相对高水平(> 200 pg/ml)的 OSM，在 3 个样品中检测到 OSM 浓度 > 1000 pg/ml。

实施例 15.1 - OA 血清中的 OSM 浓度

OA 滑液中的高浓度 OSM 令人惊讶，因为先前的报道表明 OA 滑液中的 OSM 水平往往低于 RA SF 中的水平(参见 Manicourt DH 等 (2000) Arthritis Rheum. 43 (2): 281-88)。我们又在 12 个月周期中于若干个不同的时间点使用以下实施例 16 的 ELSIA 实验测量了处于临床实验中的 OA 患者的血清 OSM 水平。图 36 表明，这些患者中的血清 OSM 浓度或者较低，或者不可检测。但是，没有对 OA 患者的血清和滑液 OSM 水平进行关联，因为样品未配对。

实施例 16 - 用于检测生物样品中低浓度 OSM 的灵敏 ELISA

我们开发了使用位点 III OSM 特异性捕获抗体 OM4-11.31 测量生物样品中的 OSM 的灵敏 ELISA。如图 37 所示，该 ELISA 允许检测低至 < 2 pg/ml 的 OSM，已用于分析血清和滑液样品。

以下给出了使用该 ELISA 和血清样品或滑液的方案。

OSM ELISA 方案

材料和试剂

11. Nunc Immunoplate F96 maxisorp (Life Technologies 4-39454A)
12. 单克隆抗人 OSM (OM4-11.31 GSK)
13. 糖基化 hOSM, 420 µg/ml (CHO 细胞糖基化)
14. 生物素化山羊抗人 OSM 50 µg/ml (R&D Systems BAF295)
15. 链霉抗生物素蛋白 HRP (Amersham RPN4401)
16. PBS (SIGMA AD8537 1 L)
17. BSA (SIGMA A7888 500 g)
18. 酚红溶液 0.5% (SIGMA P0290 100 ml)
19. TMB (SIGMA T-8665 1 L)
20. 混合的 AB 正常男性血清对照 (SIGMA H4522) 批号 #043K0500
21. 硫酸, 1 M
22. PBS 片剂 (SIGMA P4417 100 片)
23. Tween 20 (Sigma P7949)
24. 板密封物

试剂的制备

板制备 - 用 PBS 将单克隆抗人 OSM 稀释至 4 µg/ml。

加入 50 µl/孔, 用密封条覆盖, 于 4°C 过夜温育。

漂洗缓冲液 - 向 5 L 去离子水中加入 25 片 PBS 片剂 + 2.5 ml Tween 20 (0.05%)。

阻断缓冲液 - 向 500 ml PBS 中加入 10 g BSA (2%)。

(加入 800 µl 酚红和 5 M NaOH, 直至 pH 为中性)

AB 血清对照

在 Sorvall 离心机中以 16 K、30 分钟旋转 100 ml (使用 4×平衡至 0.02 g 的 Oakridge 管)。

使上清液通过无菌纱布 (仍浑浊但无颗粒)。

分成等份并冷冻。

在检测当日，融化 AB 血清，13 K 微量离心 5 分钟，并用 PBS 稀释 1→4 (血清不透明，但对使用来说已很好)

标准品制备

对于血清分析，在用 PBS 稀释 1→4 的血清中制备标准品。

对于 SF 分析，在含 1% BSA 的 PBS 溶液中制备标准品。

如果需要最高灵敏度：

使用 112、56、28、14、7、3.5、1.75 和 0 pg/ml 的 OSM。

方法

5. 用漂洗缓冲液漂洗板 4×并拍干。
6. 加入 200 μl/孔的阻断缓冲液，密封板并于室温振荡 2 小时，或于+4℃静止过夜。
7. 如步骤 1 漂洗。
8. 加入 50 μl/孔标准品或样品。覆盖并于室温搅拌 2 小时。(如果要分析血清样品，则将标准品稀释在 25%混合的 AB 血清中)
5. 如步骤 1 漂洗。
6. 加入 50 μl/孔以含 1%山羊血清的阻断缓冲液稀释至 50 ng/ml 的生物素化抗人 OSM。覆盖并于室温搅拌 1 小时。
7. 如步骤 1 漂洗。
8. 加入 50 μl/孔以阻断缓冲液稀释至 1/4000 的链霉抗生物素蛋白 HRP。覆盖并于室温搅拌 30 分钟。
9. 如步骤 1 漂洗。
10. 加入 100 μl TMB 底物。覆盖并于室温搅拌 40 分钟。
11. 为终止实验，加入 50 μl/孔的 1 M H₂SO₄。
12. 在振荡板后立即于 450 nm 读数。

SEQ.I.D.NO:1

NYGVH

SEQ.I.D.NO:2

VIWRGGSTDYNAAFMS

SEQ.I.D.NO:3

SPNSNFYWYFDV

SEQ.I.D.NO:4

SGSSSVSYMY

SEQ.I.D.NO:5

DTSNLAS

SEQ.I.D.NO:6

QQWSSYPPT

SEQ.I.D.NO:7

QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWRGG
STDYNAAFMSRLSITKDNSRSQVFFKMNSLQADDTAIY YCAKSPNSNFYWYFDVW
GTGTTVTVSS

SEQ.I.D.NO:8

QIVLTQSPTIMSASPGEKVTMTCSGSSSVSYMYWYQEKFGSSPRLIEDTSNLAS
GVPARFSGSGSGTYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPPTFGSGTKLEIK

SEQ.I.D.NO:9

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGG
 STDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWF'DVW
 GRGTLVTVSS

SEQ.I.D.NO:10

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIEDTSNLLAS
 GIPARFSGSGGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIK

SEQ.I.D.NO:11

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGG
 STDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWF'DVW
 GRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKKVEP
 KSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP E V T C V V D V S H E D P E
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFPSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

SEQ.I.D.NO:12

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIEDTSNLLAS
 GIPARFSGSGGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIKRTVA
 APSVFI F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q
 DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ.I.D.NO:15

CAGGTGCAACTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGT
CCATAACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAATAATTATGGTGTACACTGGGT
TCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGAGGTGGA
AGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCAGACTGAGCATCACCAAGGACAAC
CCAGGAGCCAAGTTTTCTTTAAAATGAACAGTCTACAAGCTGATGACTGCCAT
ATACTACTGTGCCAAAAGTCCGAATAGTAACTTTTACTGGTATTTTCGATGTCTGG
GGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:16

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAACAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGG
TCACCATGACCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCAGGA
GAAGCCAGGATCCTCCCCAGACTCCTGATTGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
GGAGTCCCTGCTCGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAA
TCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
TTATCCACCCACGTTTCGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATCAAA

SEQ.I.D.NO:17

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCATTAATAATTATGGTGTACACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGTGGA
AGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCCATTACCATCTCCAAGGACAATT
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGT
GTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACTTTTACTGGTATTTTCGATGTCTGG
GGCCGTGGCACACTAGTACAGTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:18

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCAACA
GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
GGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTACACTCTCACCA
TCAGCAACCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
TTATCCACCCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

SEQ.ID.NO:19

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCATTAACTAATTATGGTGTACACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGTGGA
AGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCCGATTACCATCTCCAAGGACAATT
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGT
GTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACTTTTACTGGTATTTTCGATGTCTGG
GGCCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
TCCCCCTGGCACCcTCCtCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCC
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACT
CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGG
GGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCCTCACCGTCCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCCAGCCCCCAtCGAGAAAACCAtCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGaACCAGGTGAG
CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCG
ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
GGGGAACGTcTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ.ID.NO:20

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGTATTGGTACCAACA

GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
GGCATCCCAGCCAGGTTTCTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTACACTCTCACCA
TCAGCAACCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
TTATCCACCCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCT
GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTG
CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG
GAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCCACAGAGCAG
GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAG
ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ.I.D.NO:21

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFLSTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
GSTDYNAAFMSRLTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
VWGRGTLVTVSS

SEQ.I.D.NO:40

DYNMD

SEQ.I.D.NO:41

DINPNNGGTIDNQKFKD

SEQ.I.D.NO:42

GIYYYYGSHYFDY

SEQ.I.D.NO:43

SATSSVSVMH

SEQ.I.D.NO:44

DTSKLAS

SEQ.I.D.NO:45

QQWSSNPLT

SEQ.I.D.NO:46

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYIFTDYNMDWVKQSHGKKLEWIGDINPNN
GGTIDNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDVAVYYCARGIYYYGSHYFDY
WGQGTTLTVSS

SEQ.I.D.NO:47

QIVLTQSPAIMASAPGKVTMTCSATSSVSMHWFQKKSGTSPKRWIYDTSKLAS
GVPTRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDTATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLELK

SEQ.I.D.NO:48

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTDYNMDWVRQAPGQKLEWIGDINPNN
GGTIDNQKFKDRATLTVDKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGIYYYGSHYFDY
WGQGTTLTVSS

SEQ.I.D.NO:49

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSATSSVSMHWFQKKPGKAPKRWIYDTSKLAS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVDIK

SEQ.I.D.NO:50

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTDYNMDWVRQAPGQKLEWIGDINPNN
GGTIDNQKFKDRATLTVDKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGIYYYGSHYFDY
WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNY
TQKSLSLSPGK

SEQ.I.D.NO:51

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCSATSSVSMHWFQKKPGKAPKRWIYDTSKLAS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVDIKRTVA
APSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGEC

SEQ.I.D.NO:52

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGA
AGATATCCTGCAAGGCCTCTGGATACATATTCACCTGACTACAACATGGACTGGGT
GAAGCAGAGCCATGGAAAGAACTTGAGTGGAT'TGGAGATATTAATCCTAATAAT
GGTGGTACTATCGACAACCAGAGTTCAAGGACAAGGCCACAT'TGACTGTAGACA
AGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGC
AGTCTATTACTGTGCAAGAGGGATTTATTACTACGGTAGTCACTACTTTGACTAT
TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:53

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAC
CATGACCTGCAGTGCCACCTCAAGTGTAAGTGTGCATGCCTGGTTCCAGAAGAAGTCAG
GTACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTACT
CGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAATCAGTAGCATGGAGGC
TGAAGATACTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACTCACGTTCCGTT
CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

SEQ.I.D.NO:54

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
TTCCTGCAAGGCATCTGGATACATATTCACCGACTACAACATGGACTGGGTGCGACAGG
CCCCTGGACAAAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAATAATGGTGGTACTATC
GACAACCAGAAGTTCAAGGACAGAGCCACCTTGACCGTAGACAAGTCCACGAGCACAGT
CTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAG
GGATTTATTACTACGGTAGTCACTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACACTAGTCACA
GTCTCCTCA

SEQ.I.D.NO:55

GAAATTGTGTTGACGCGAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCA
CATCACTTGAGTCCACCTCAAGTGTAAGTGTGCATGCCTGGTTCCAGAAGAAACCAG
GGAAAGCCCCTAAGAGATGGATCTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGGGTCCCATCA
AGGTTAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACTCACGTTCCGGC
GAGGGACCAAAGTGGATATCAAA

SEQ.I.D.NO:56

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
TTCCTGCAAGGCATCTGGATACATATTCACCGACTACAACATGGACTGGGTGCGACAGG

CCCCTGGACAAAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAATAATGGTGGTACTATC
 GACAACCAGAAGTTC AAGGACAGAGCCACCTTGACCGTAGACAAGTCCACGAGCACAGT
 CTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAG
 GGATTTATTACTACGGTAGTCACTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACACTAGTCACA
 GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG
 CACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
 TGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC
 CTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
 GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
 AGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCT
 GAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCAT
 GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
 AGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
 CGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCAGTACCGTGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
 GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCC
 CCAATCGAGAAAACCaTCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC
 CTGCCCCCaTCCCGGGATGAGCTGACCAAGaACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
 AGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
 ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAG
 CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ.I.D.NO:57

GAAATTGTGTTGACGCGAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCA
 CATCACTTGCAGTGCCACCTCAAGTGTAAAGTGTATGCACTGGTTCCAGAAGAAACCAG
 GGAAAGCCCCTAAGAGATGGATCTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGGGTCCCATCA
 AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
 TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACTCACGTTCCGGCG
 GAGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCC
 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACT
 CTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACT
 CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
 CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCCA
 TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ.I.D.NO:61

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
 KVEPKSCDKTHTCPPCPAELAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ.I.D.NO:62

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCATTAACTAATTATGGTGTACTACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGT
GGAAGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCCGATTACCCATCTCCAAGGAC
AATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG
GCTGTGTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACTTTTACTGGTATTTTCGAT
GTCTGGGGCCGTGGCACACTAGTCAAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
TCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAC
TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATCACACATGCCACCGTGCCAGCA
CCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAG
CTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC
ACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

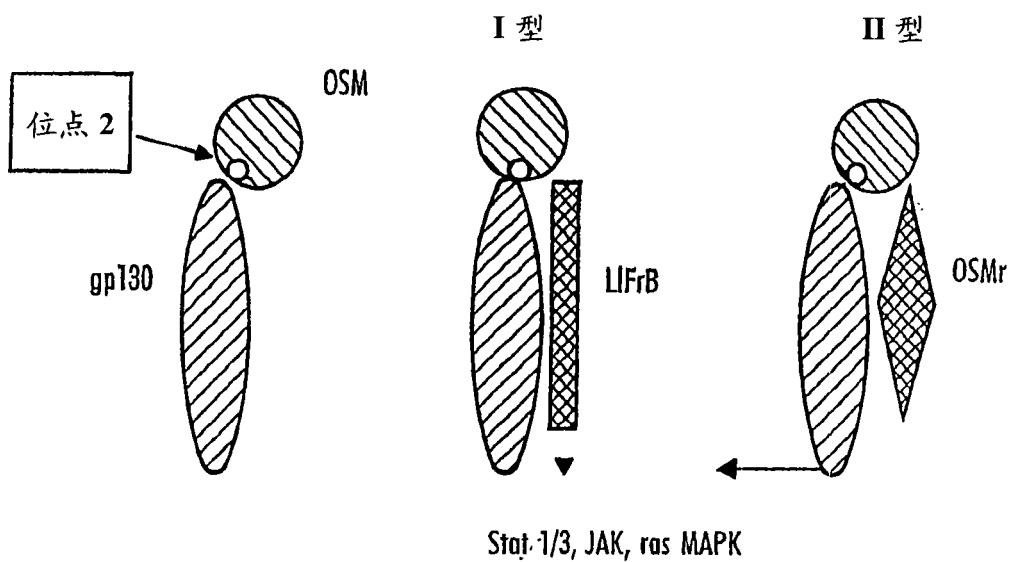


图 1

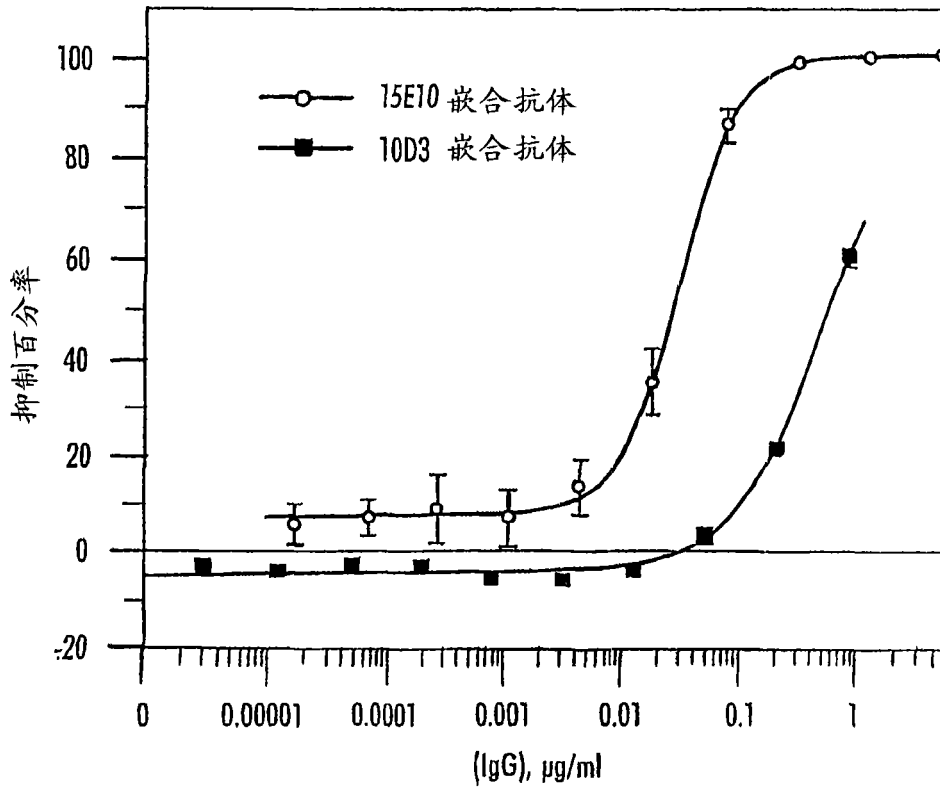
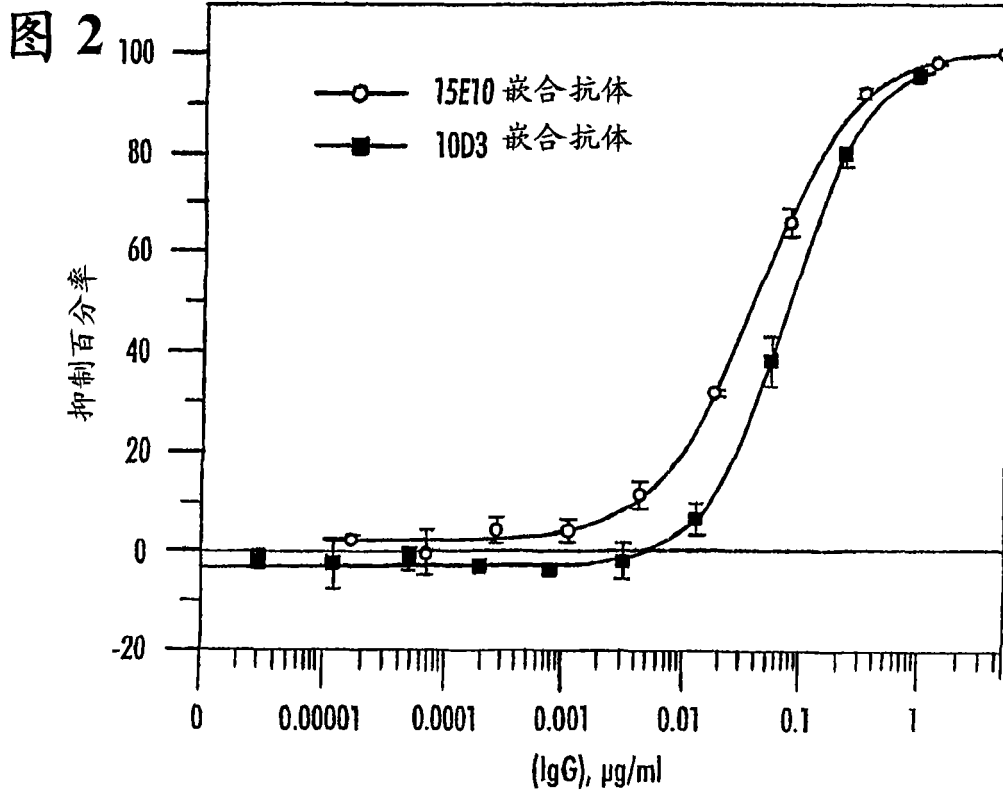
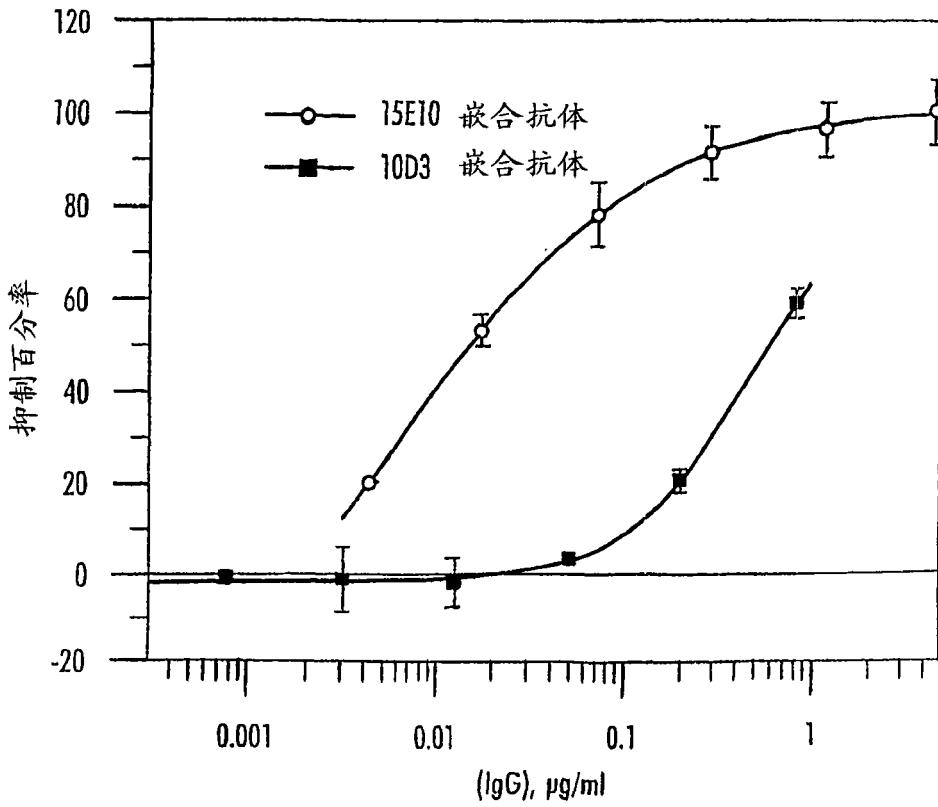
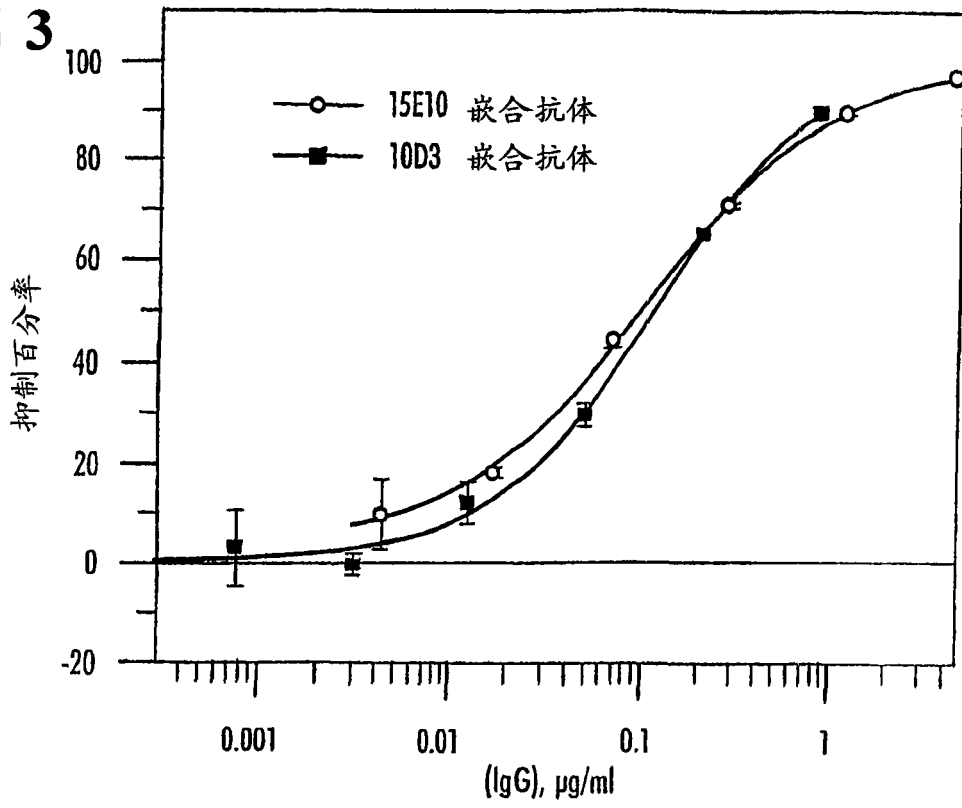
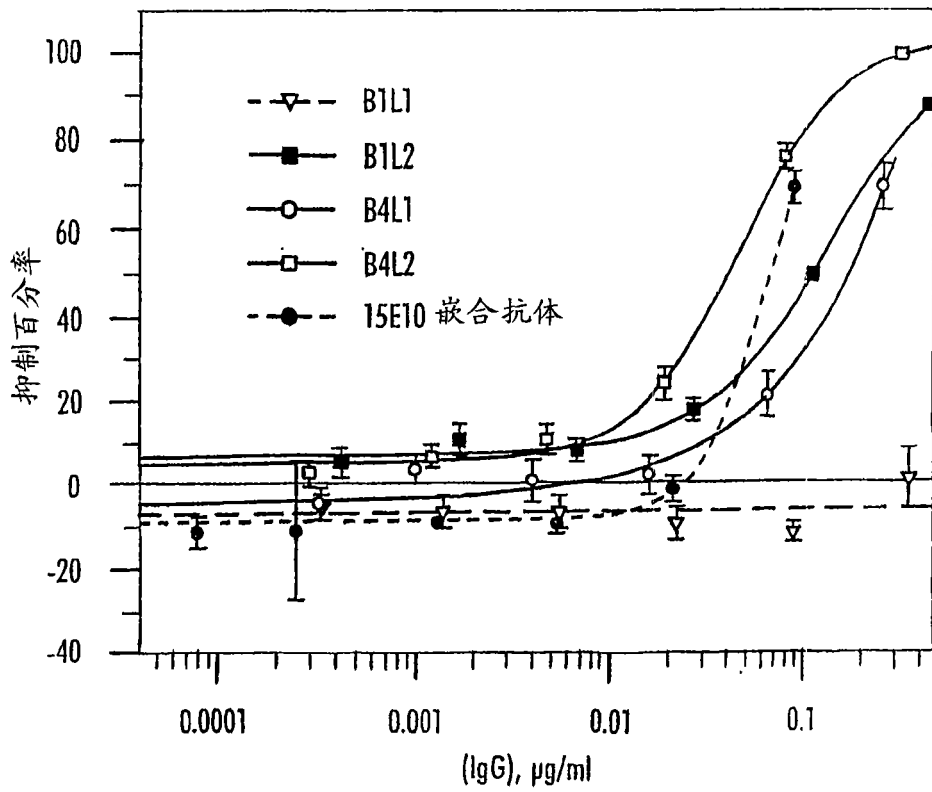
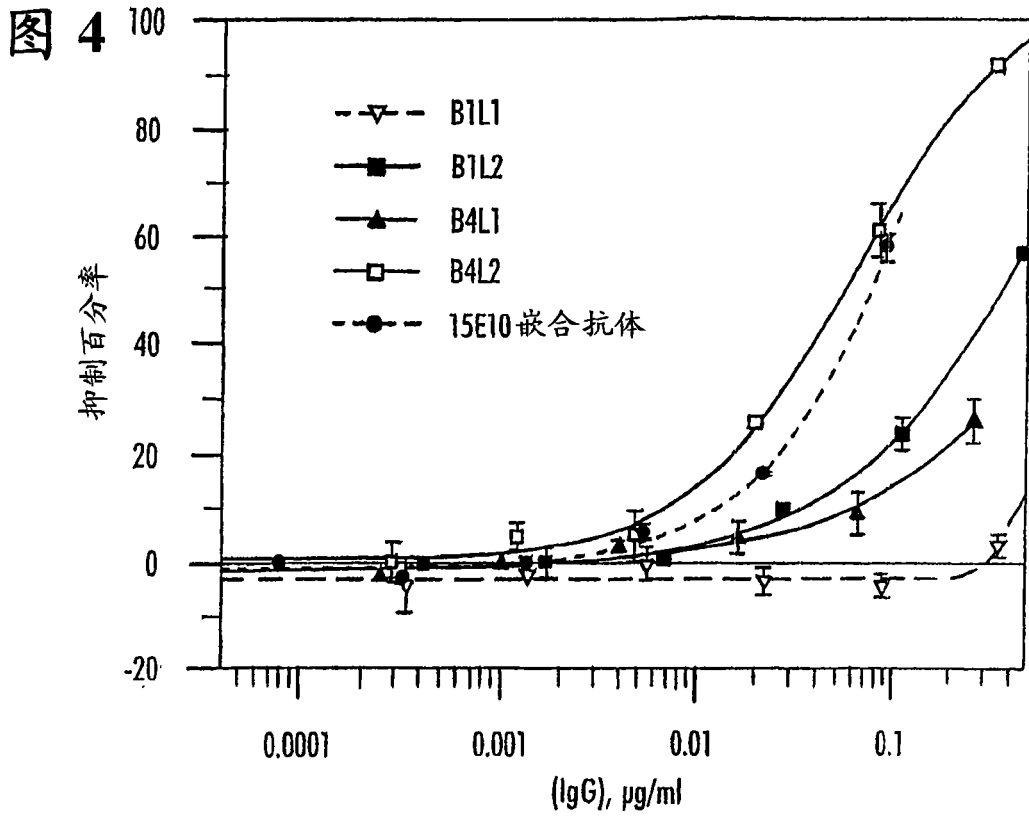


图 3





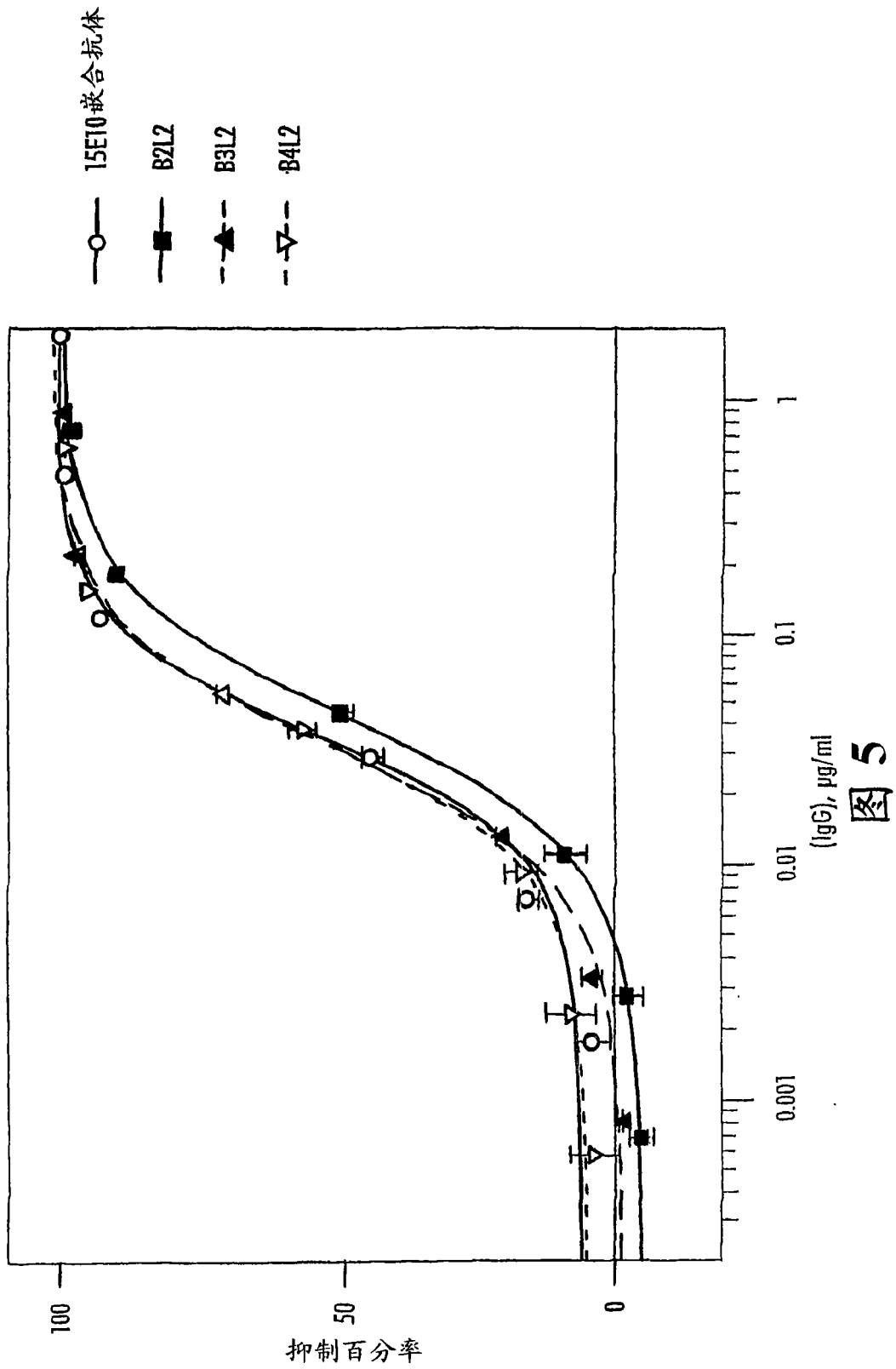


图 5

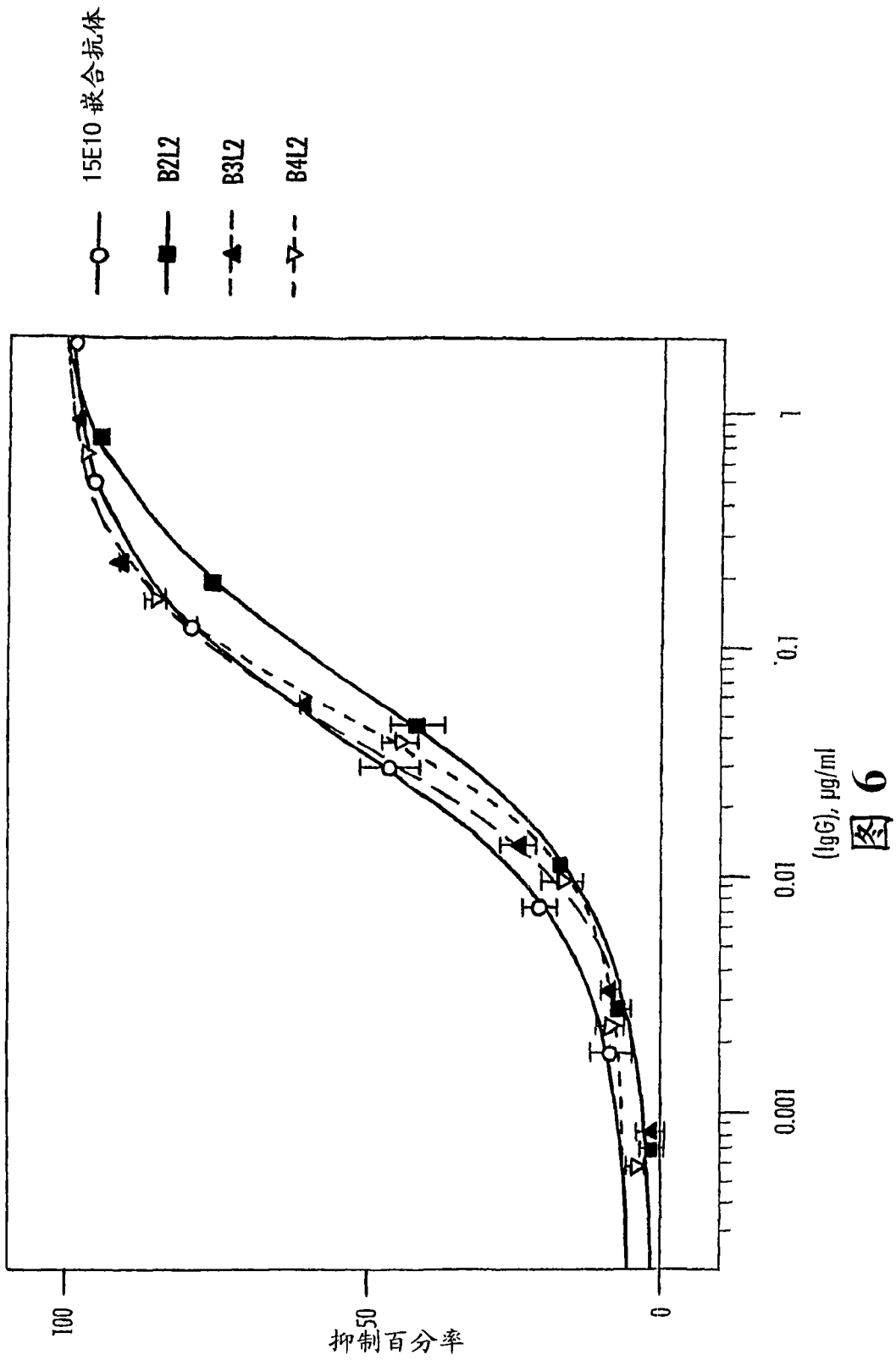


图 6

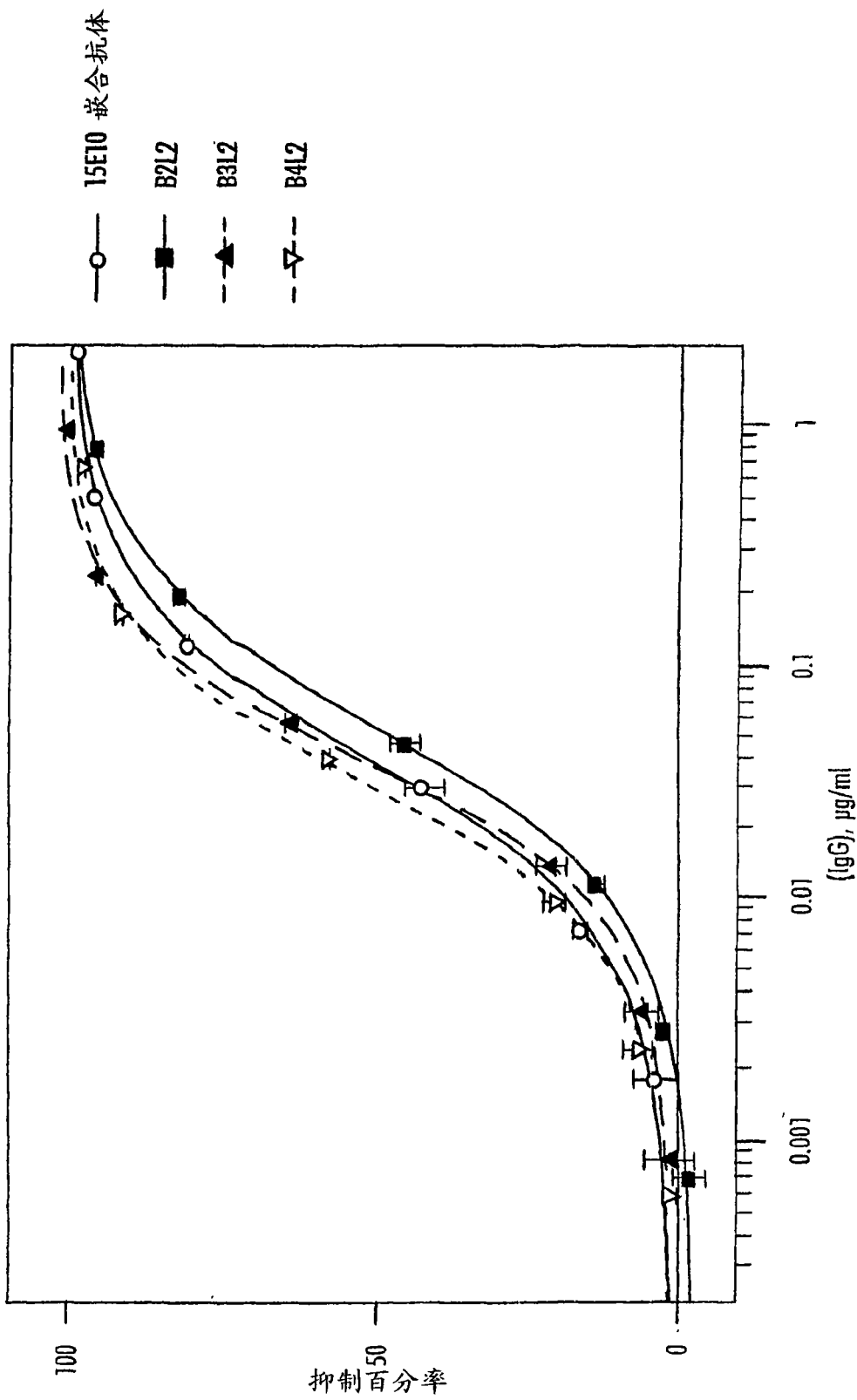
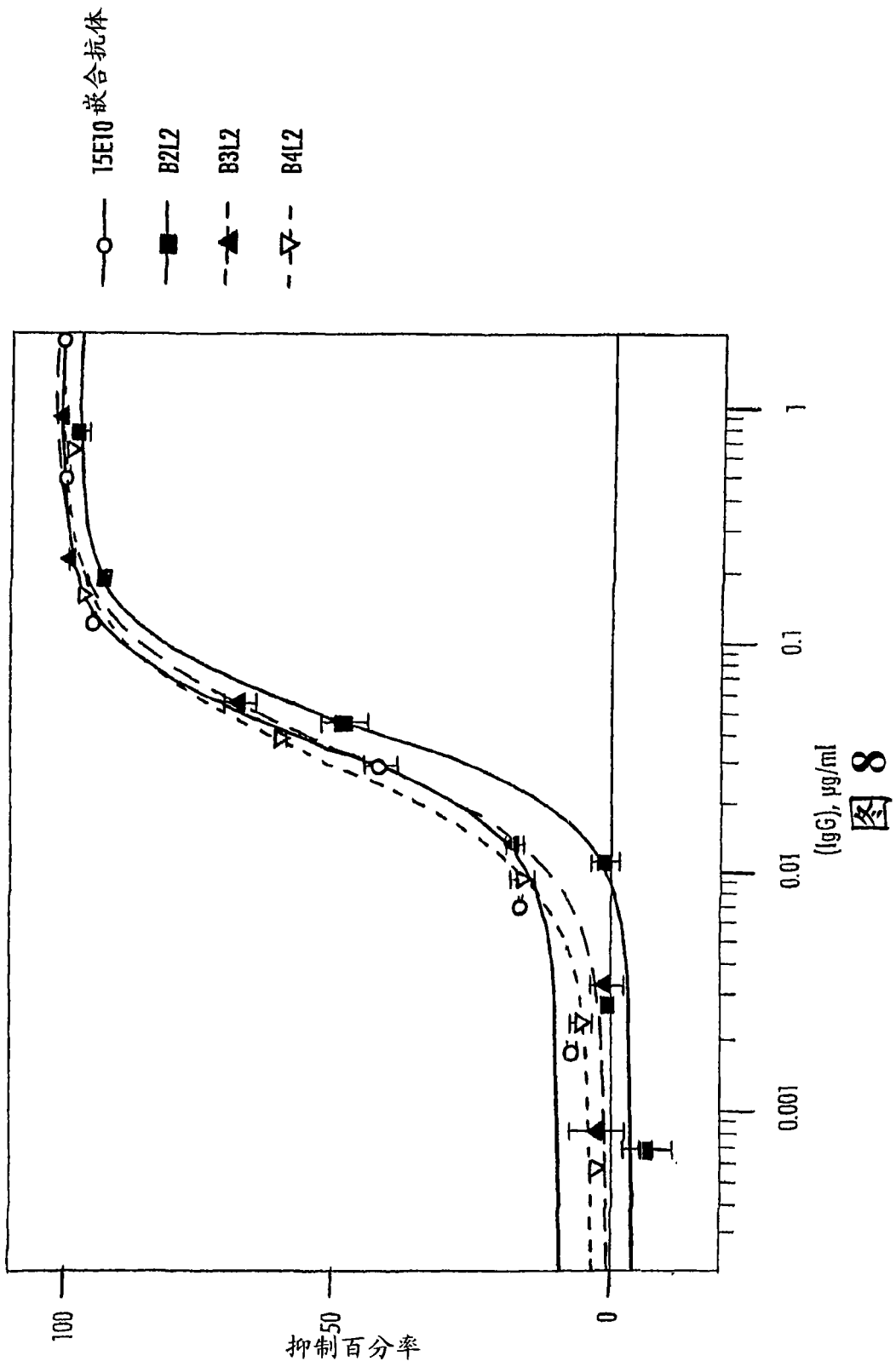


图 7



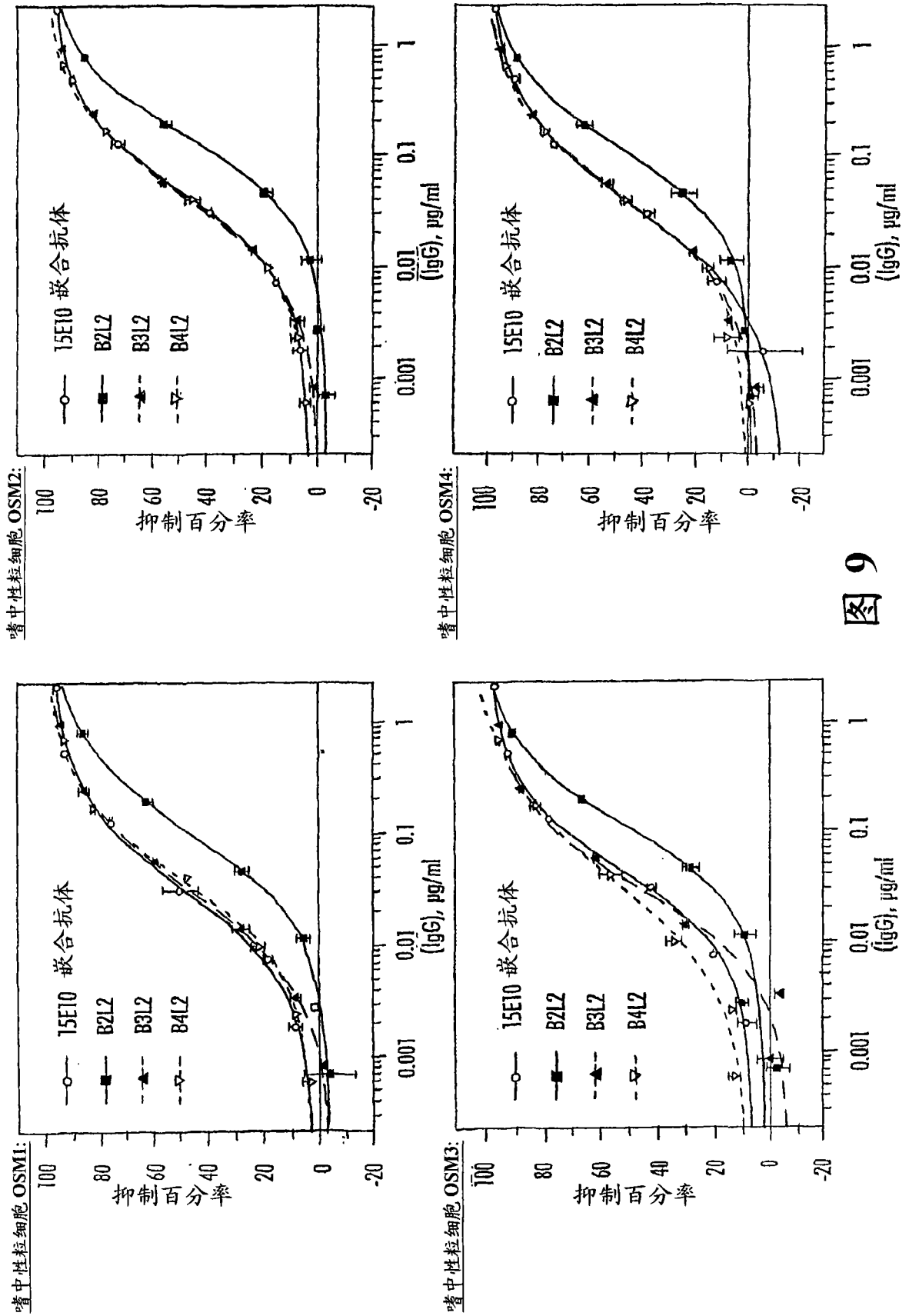


图 9

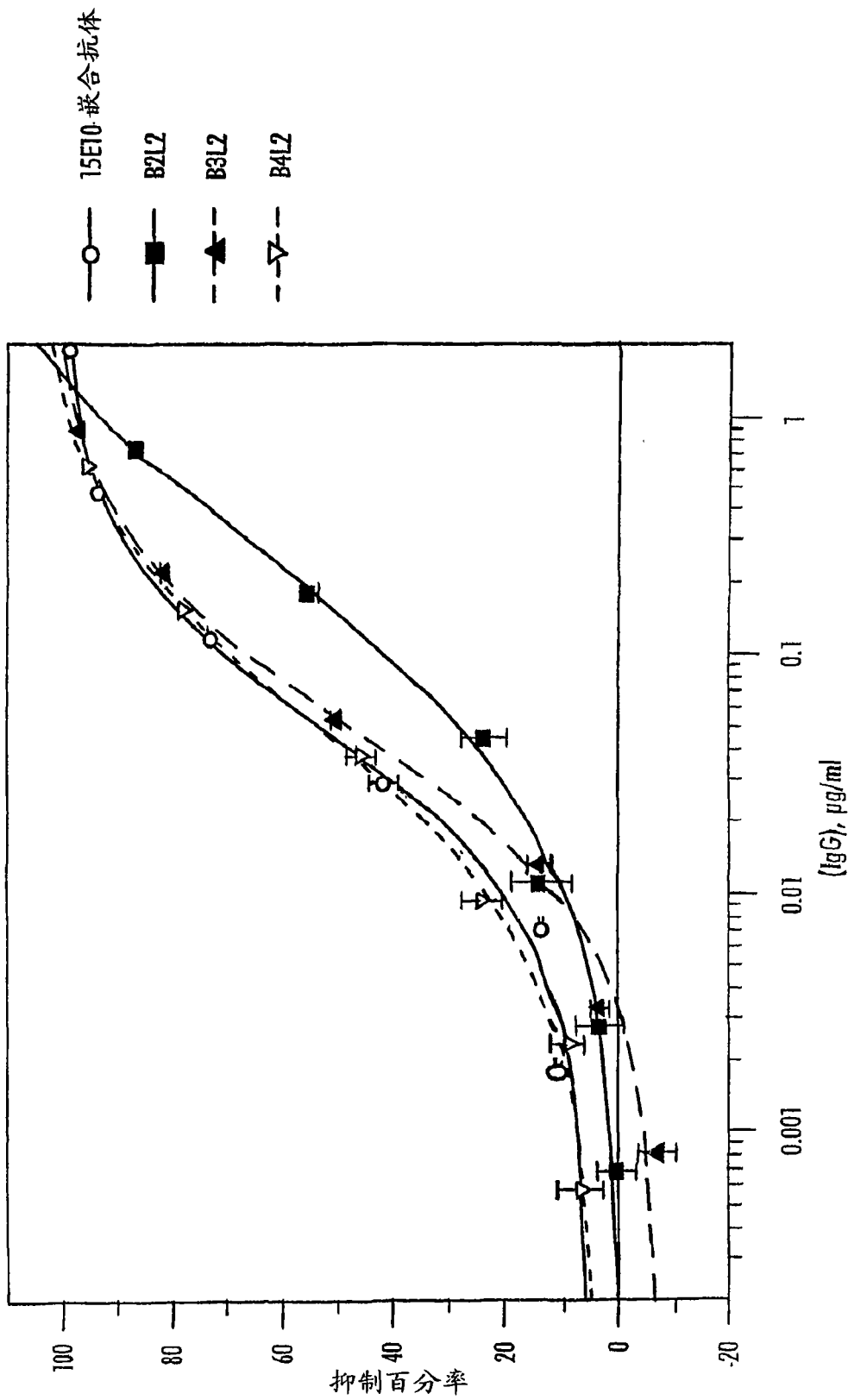


图 10

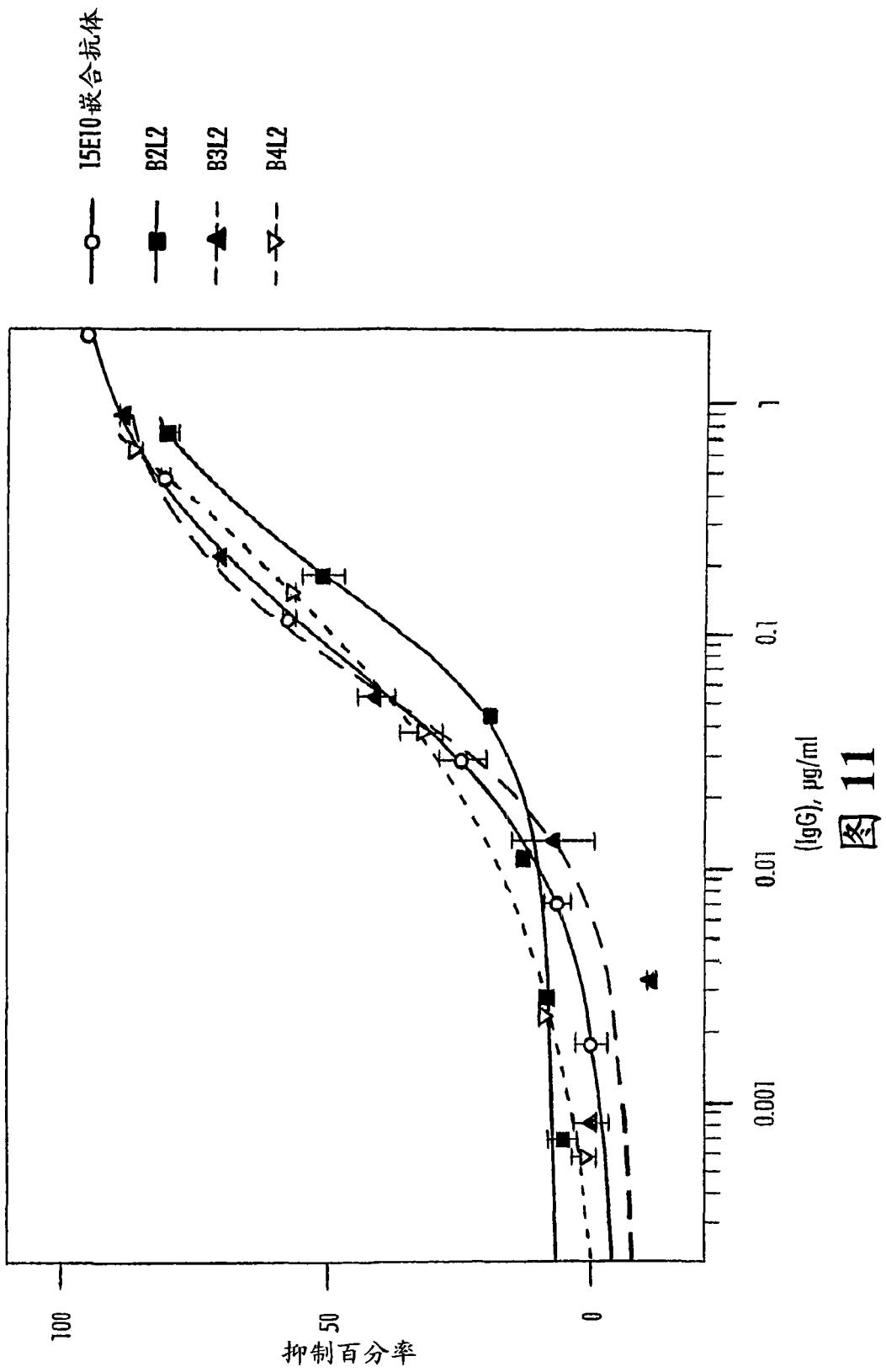


图 11

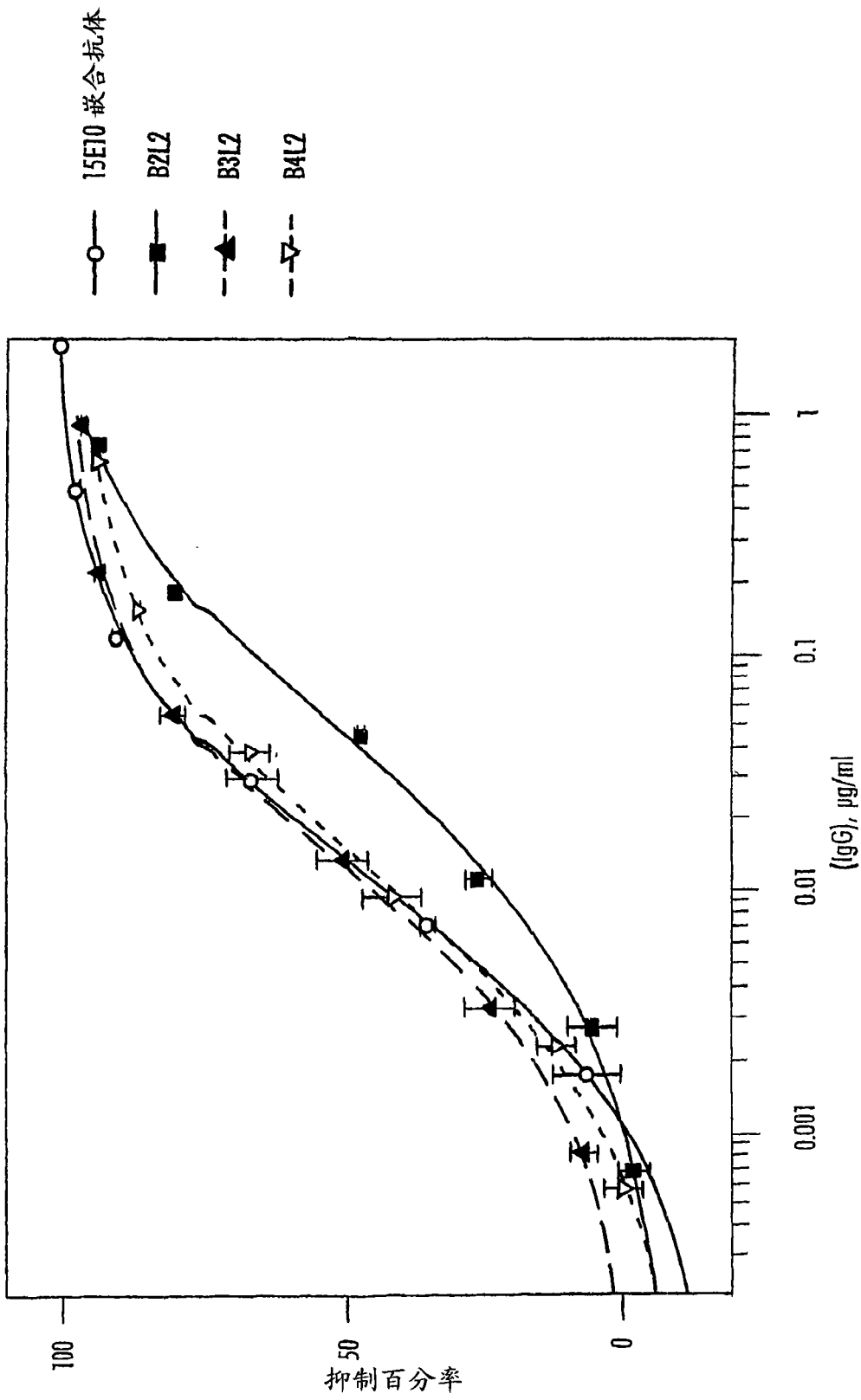


图 12

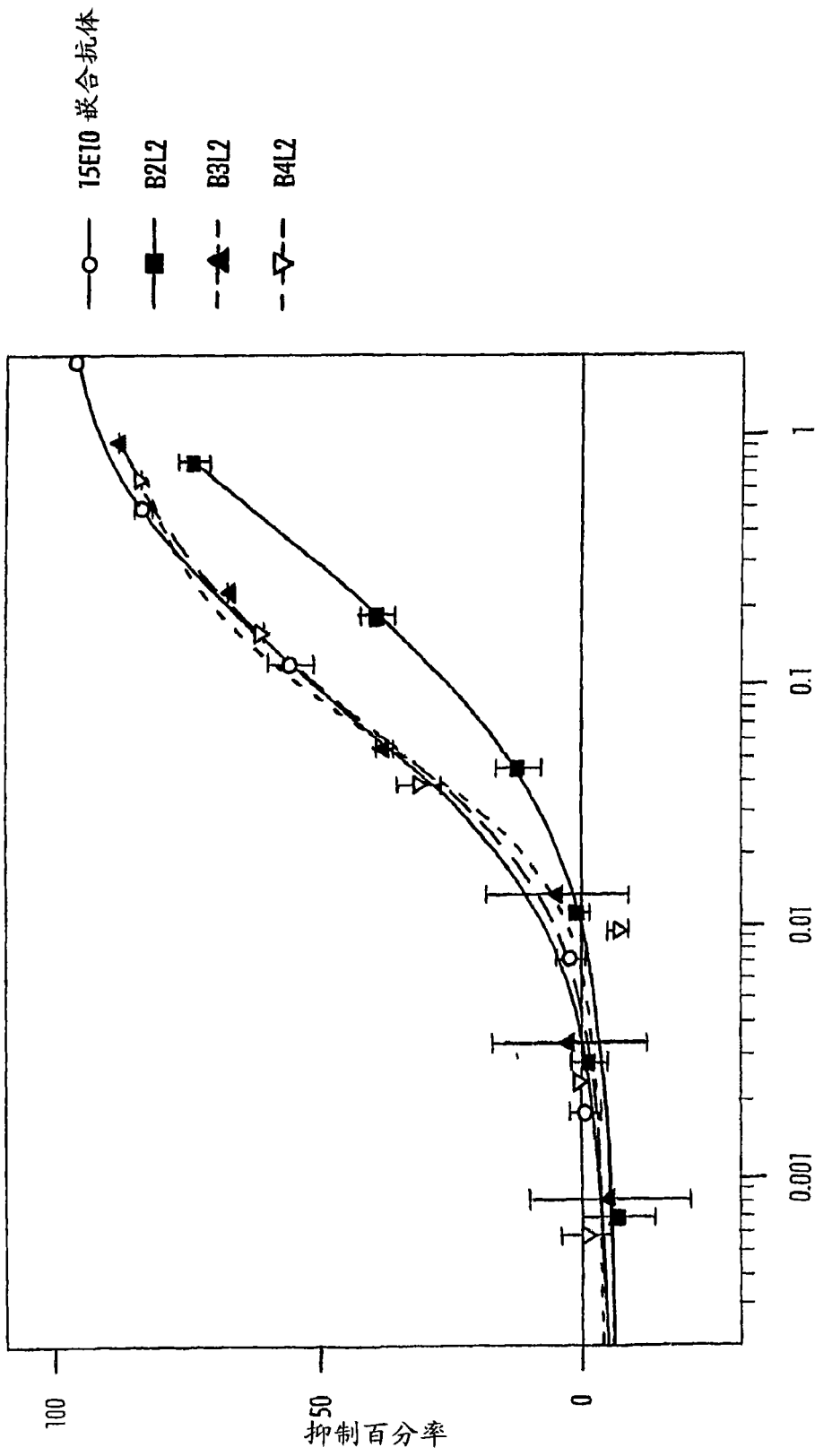
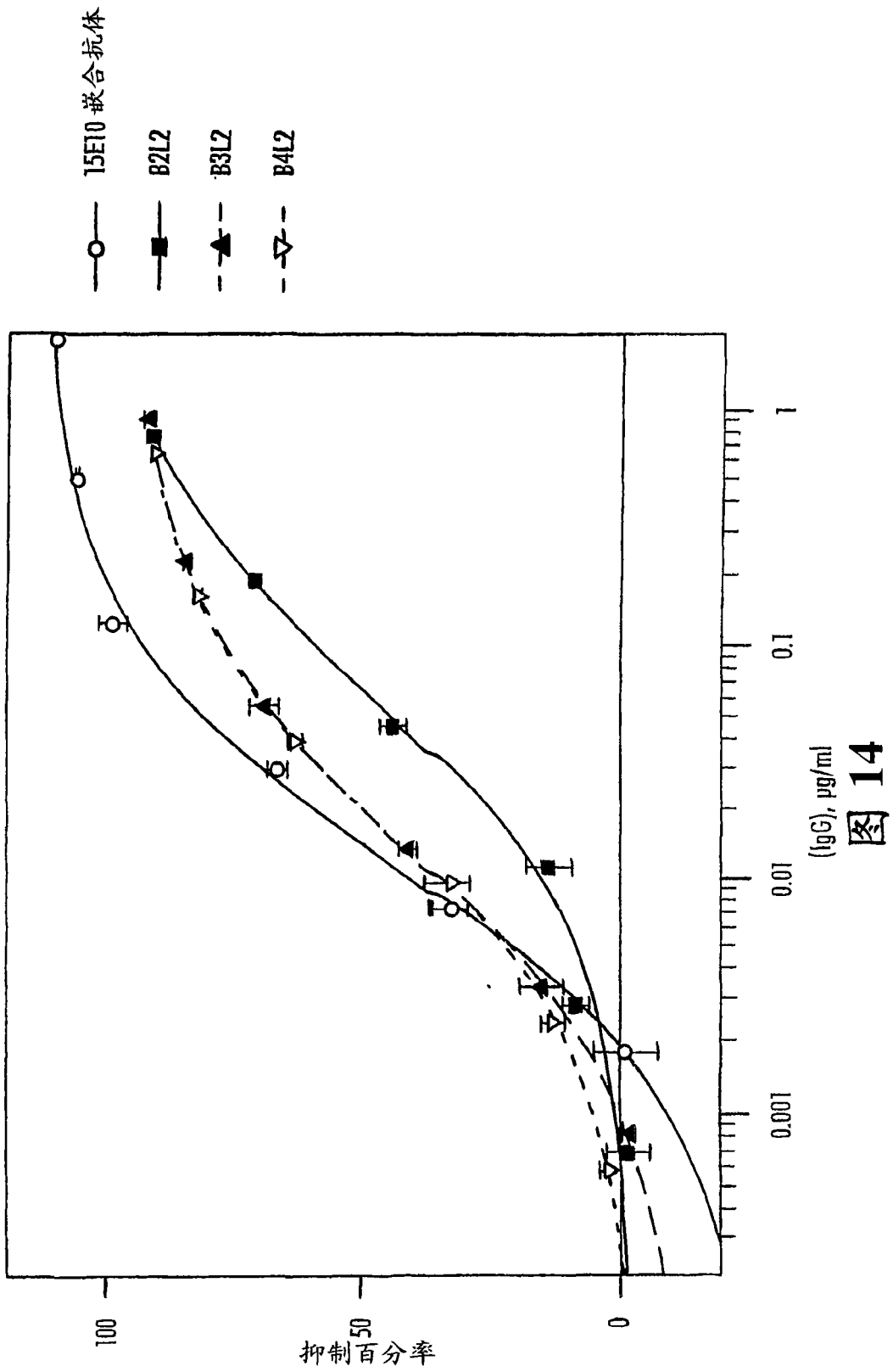


图 13



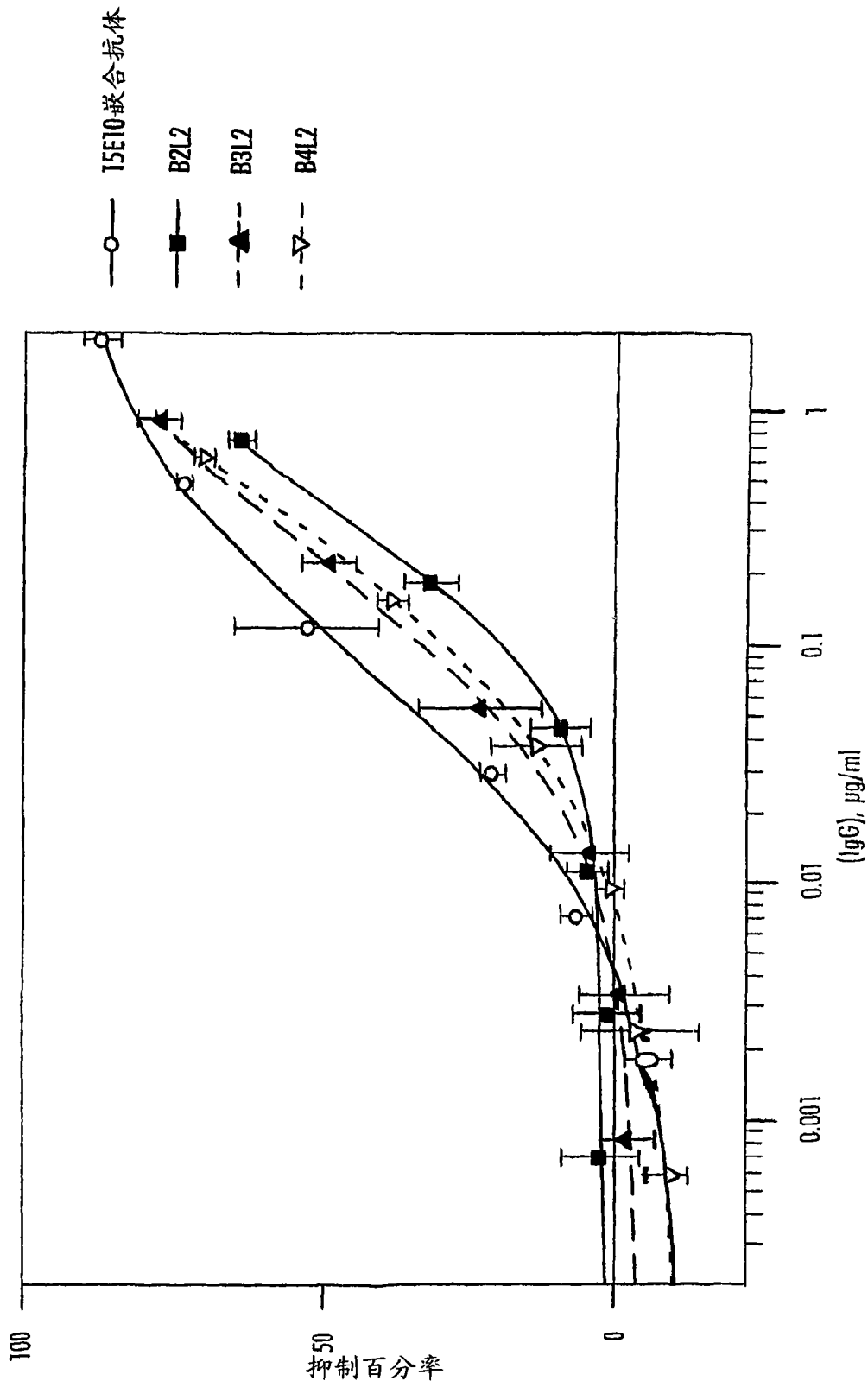


图 15

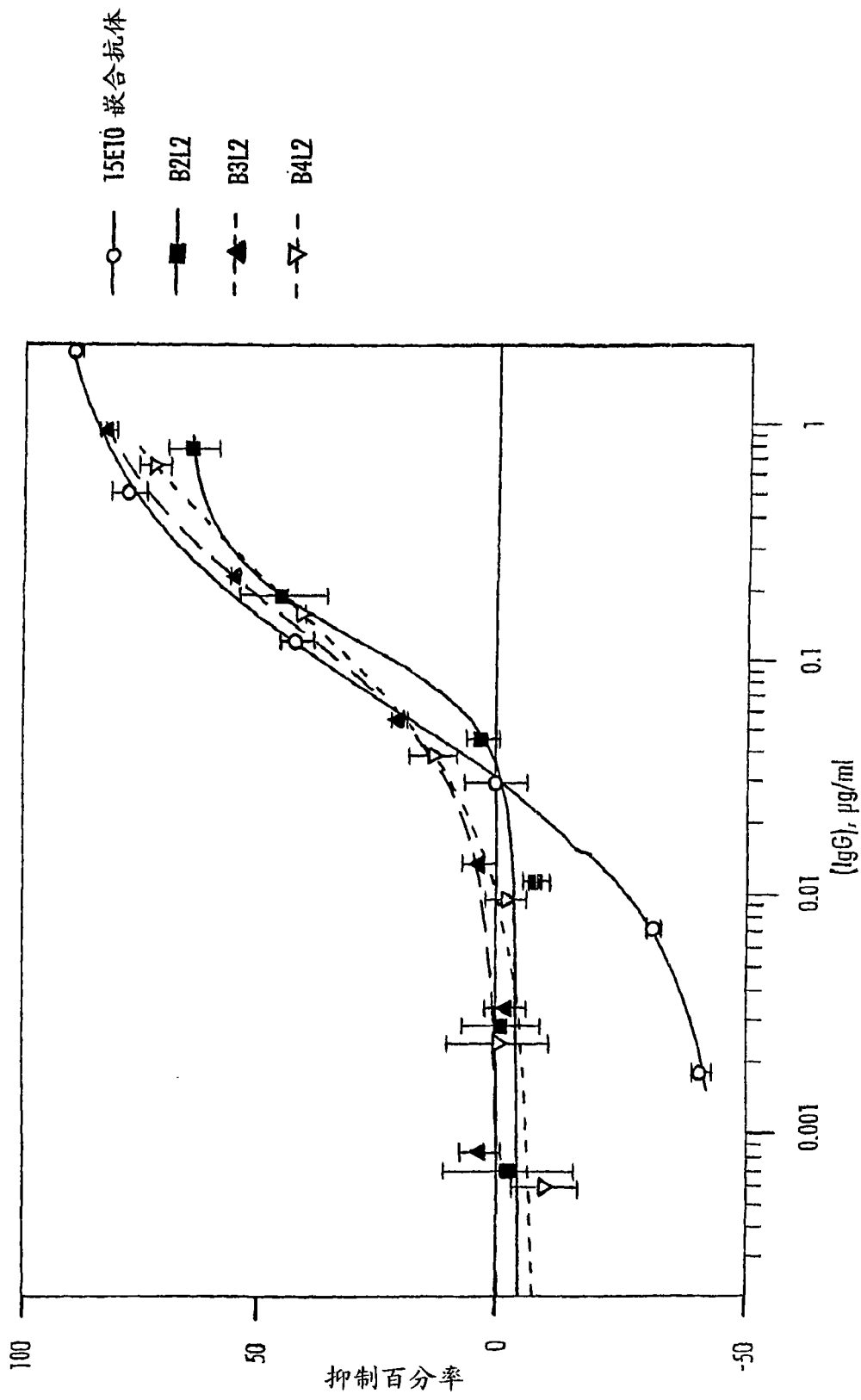


图 16

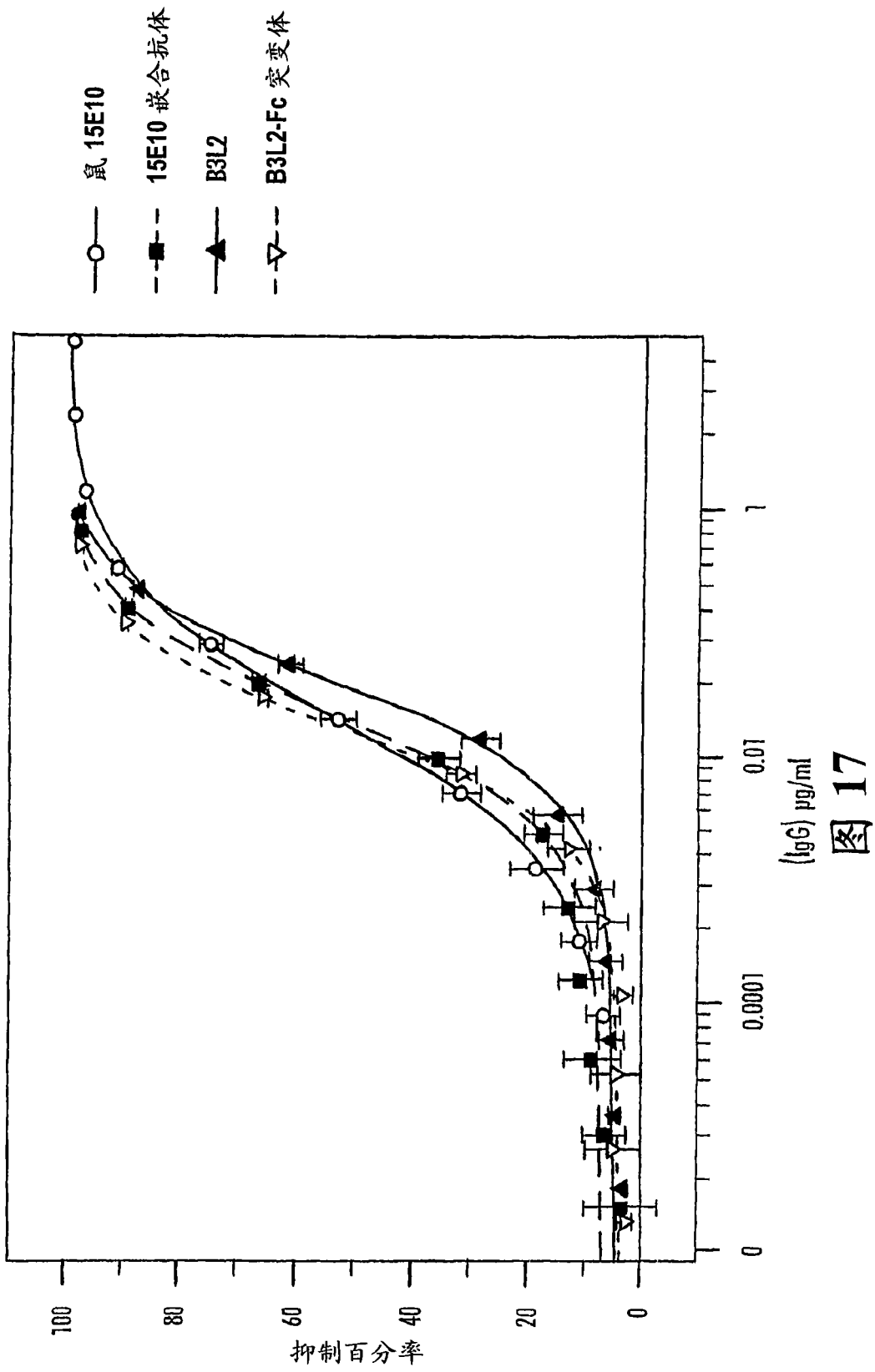


图 17

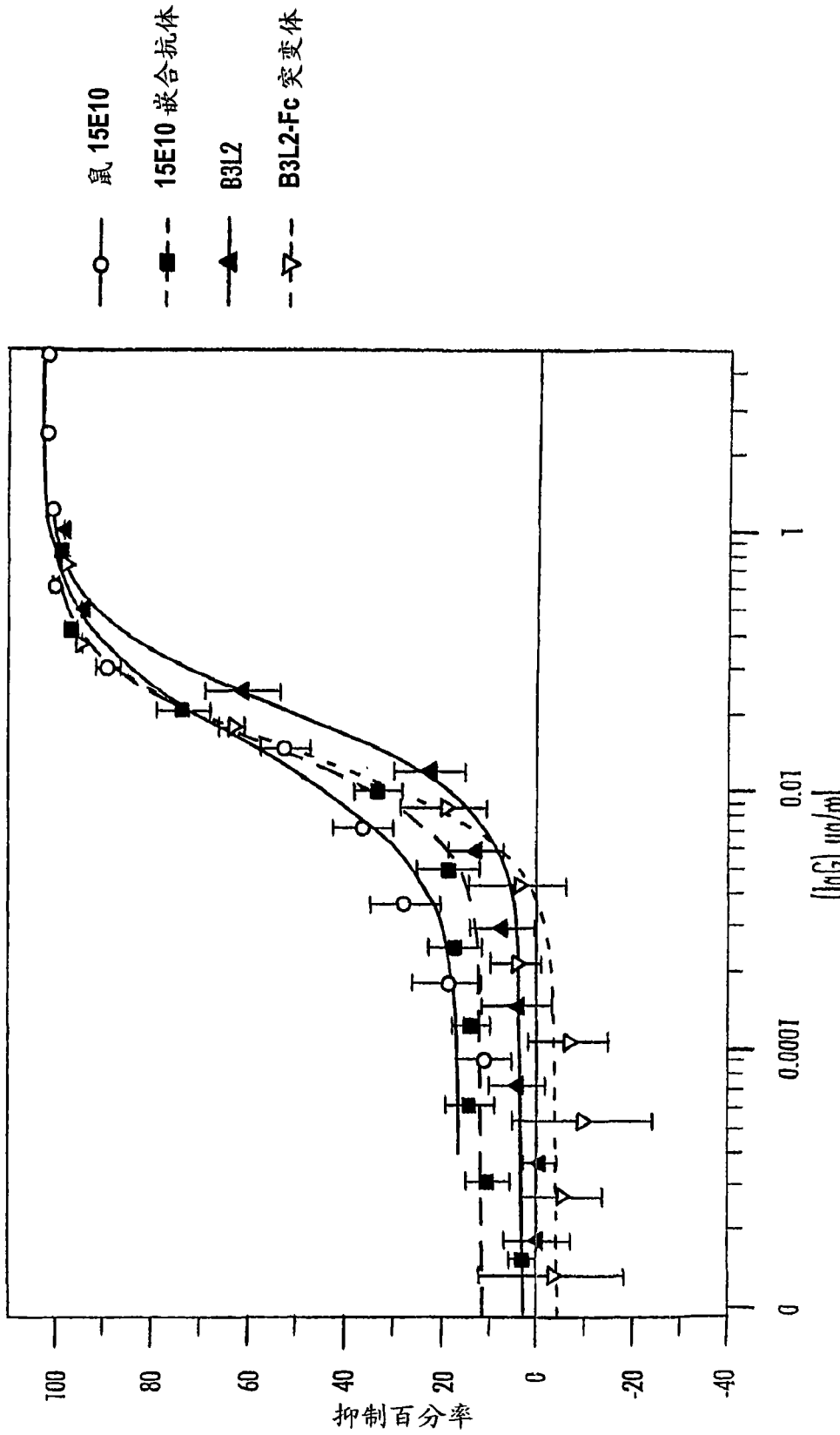


图 18

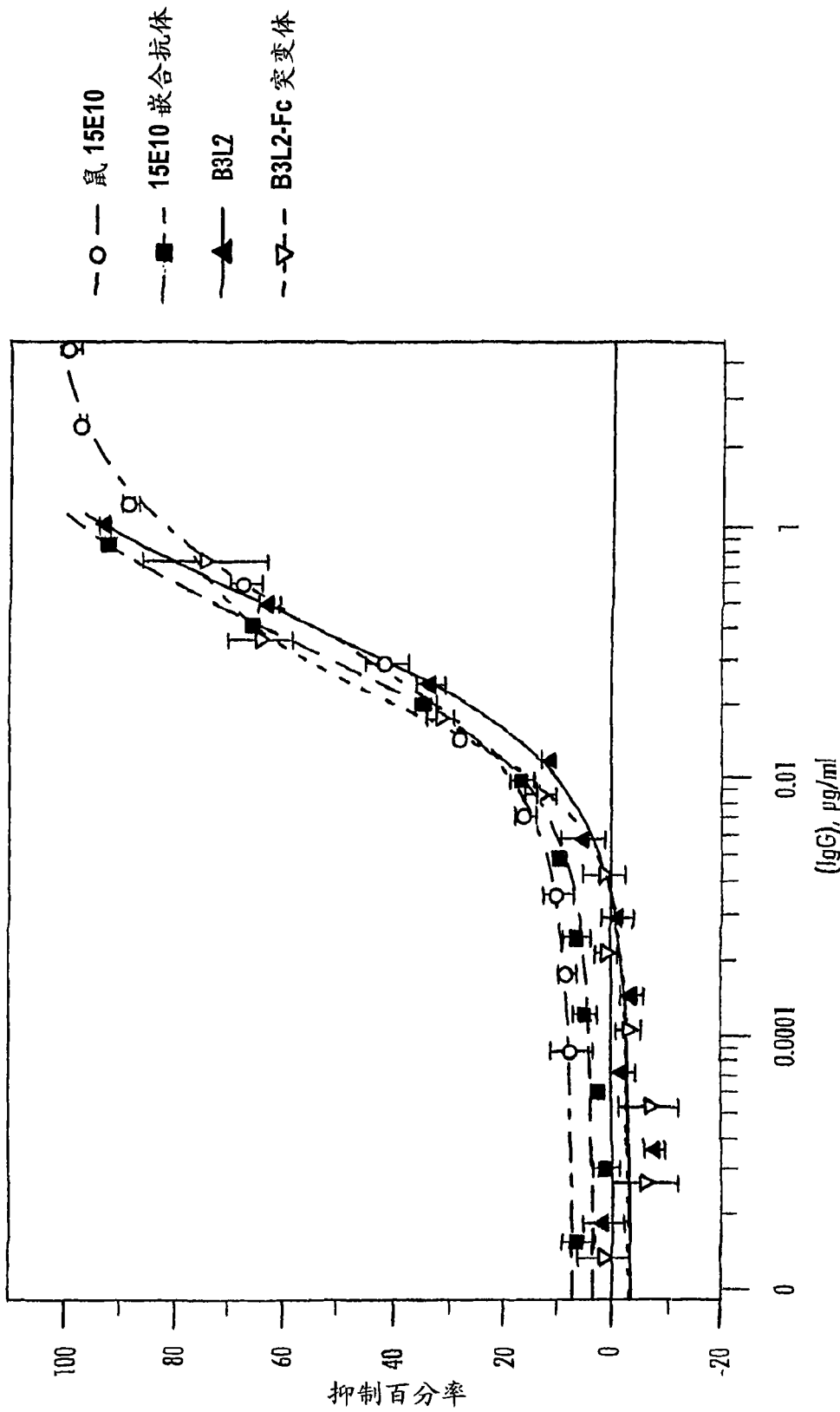


图 19

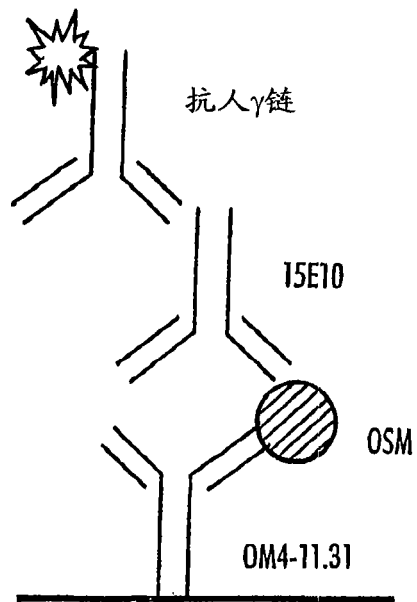


图 20

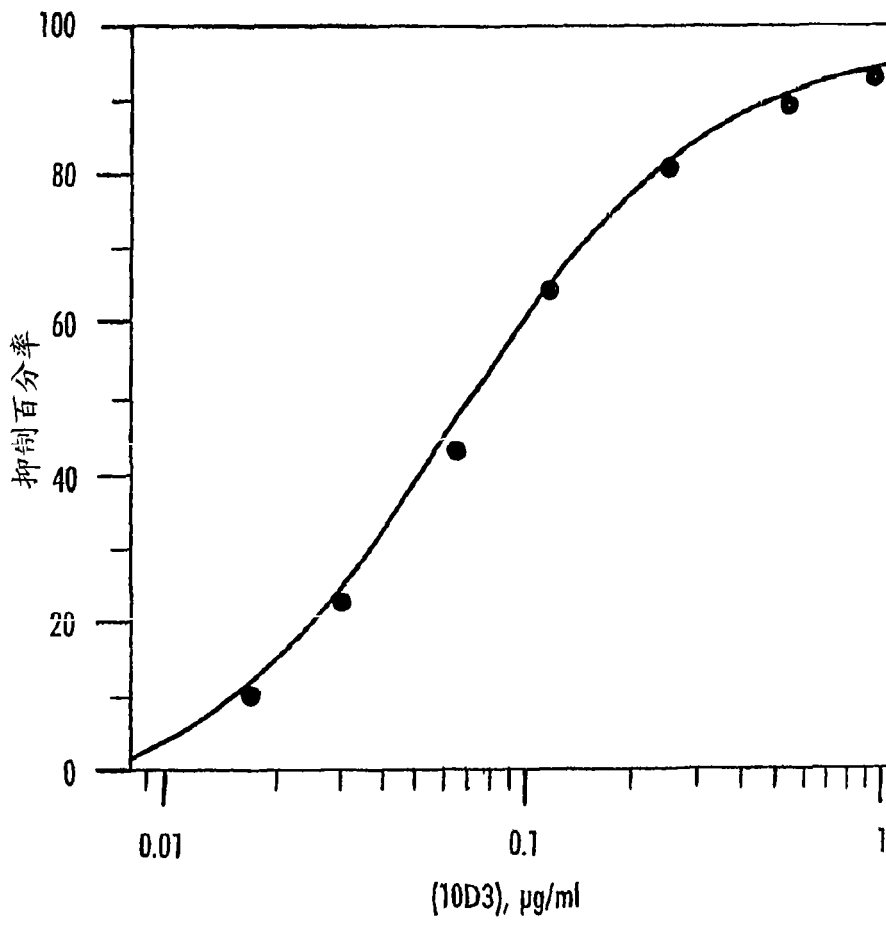


图 21

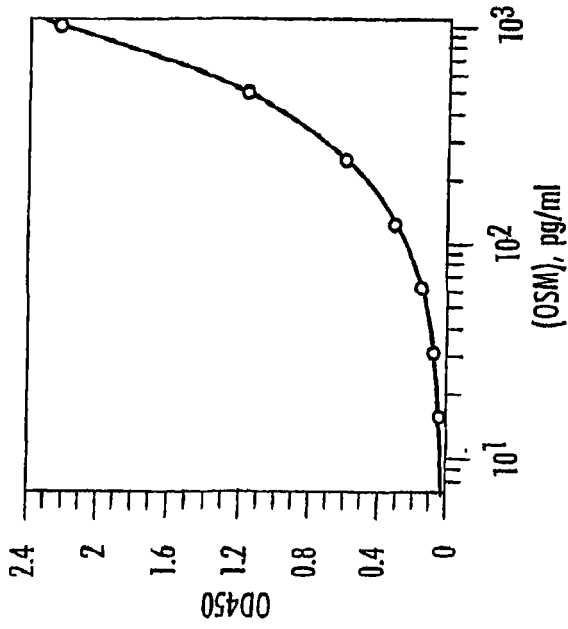


图 22a

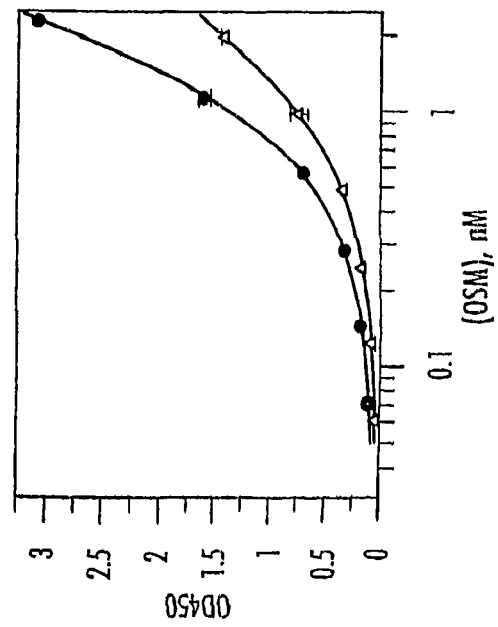


图 22b

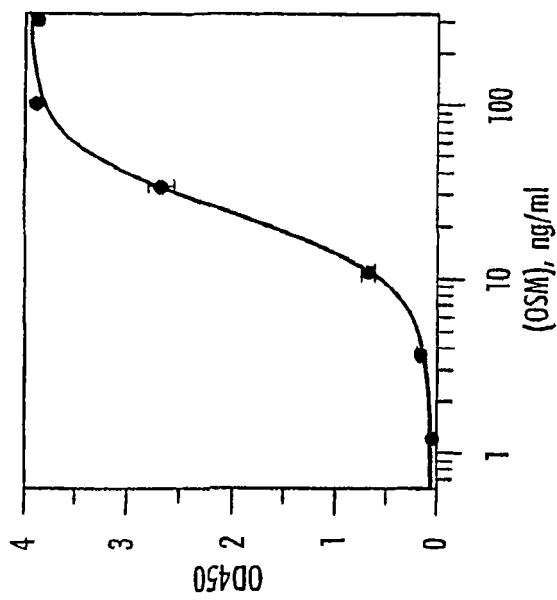


图 22c

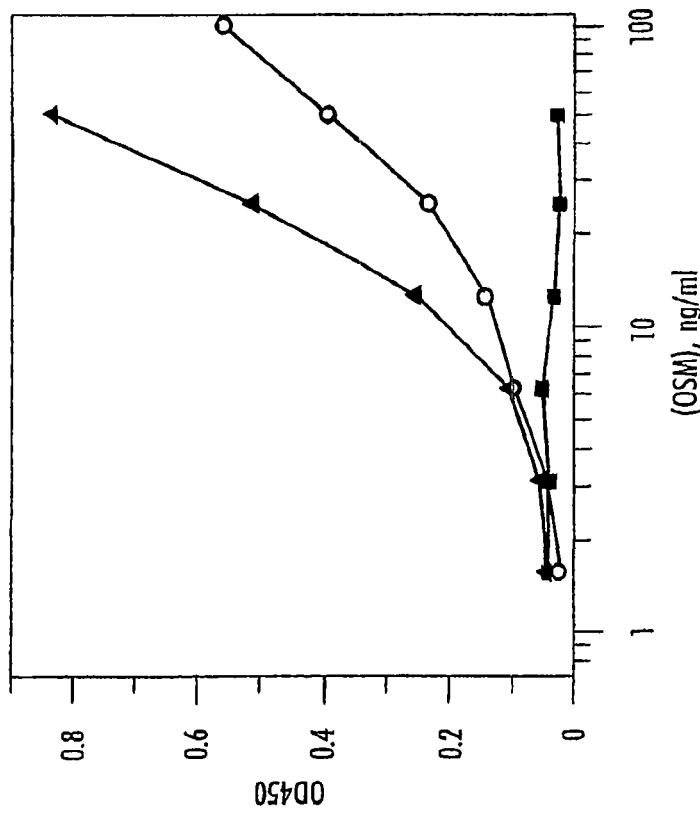


图 23a

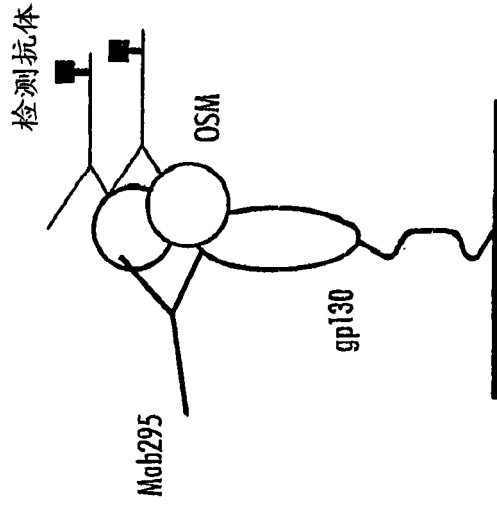


图 23b

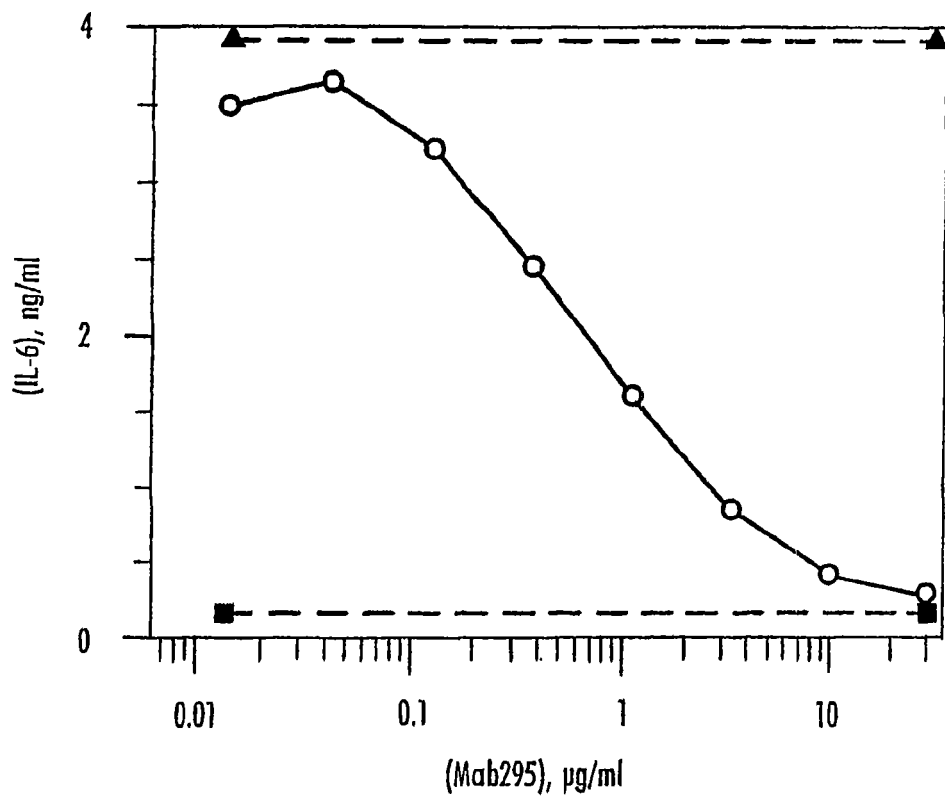


图 24

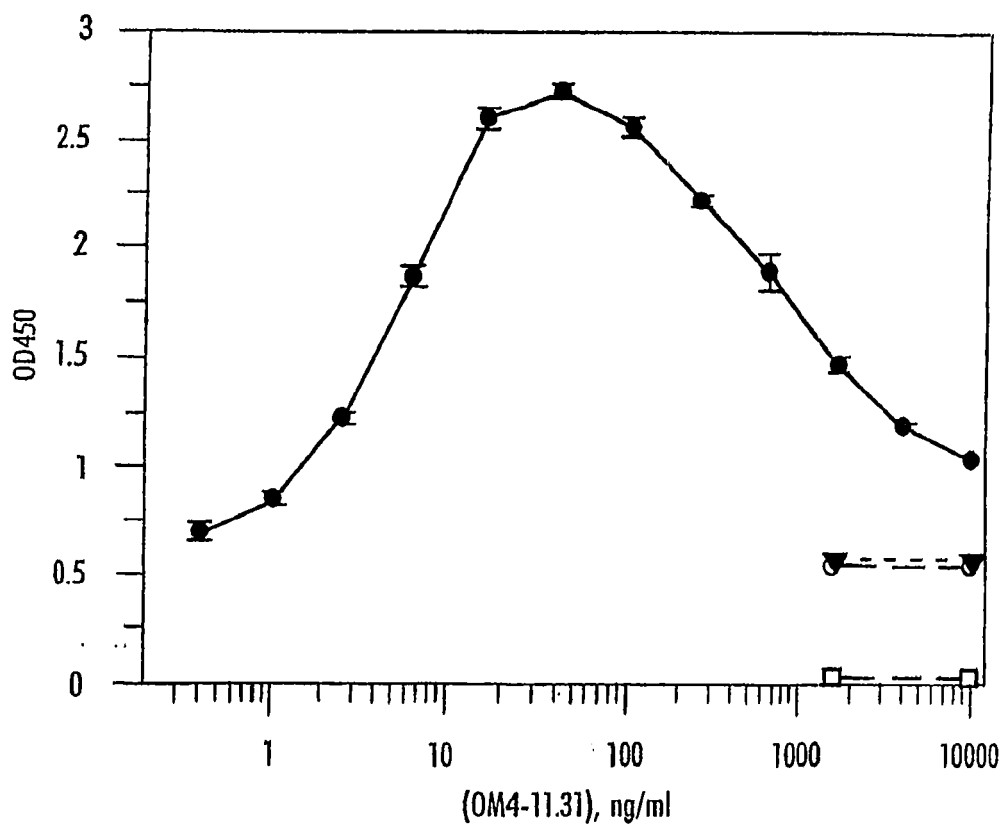


图 25

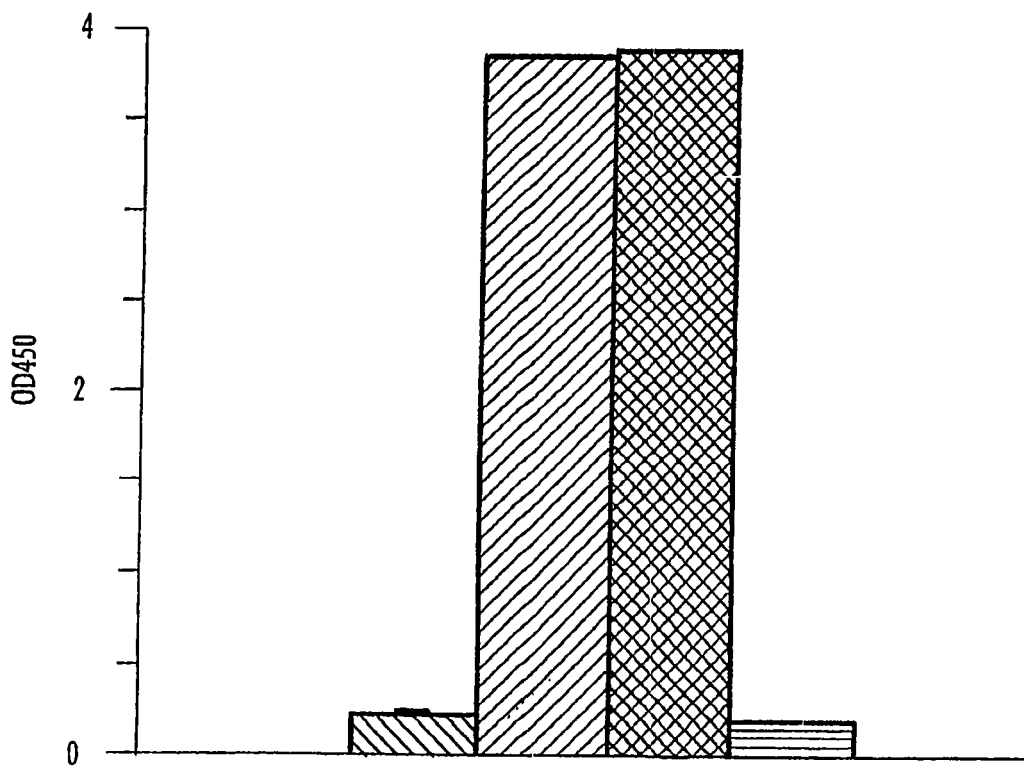


图 26

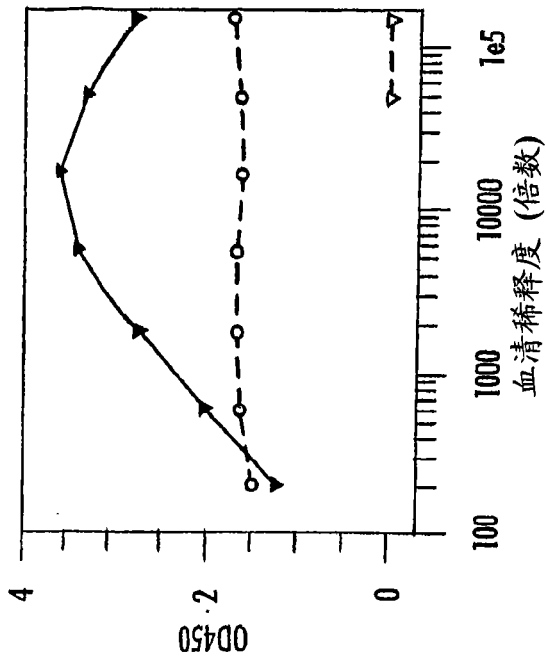


图 27b

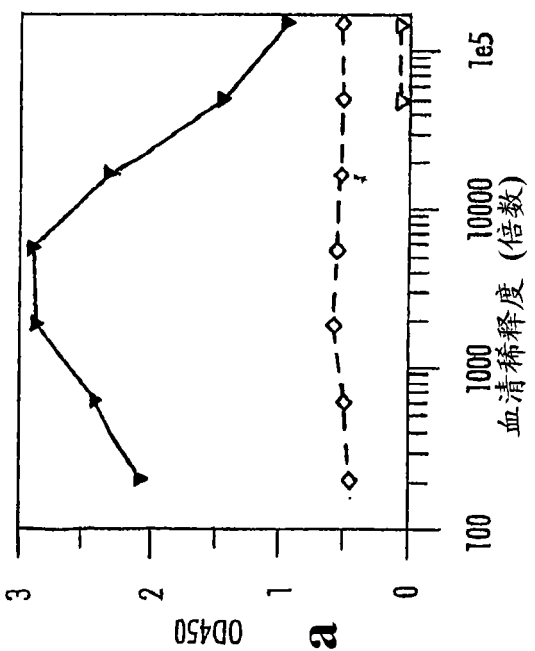


图 27a

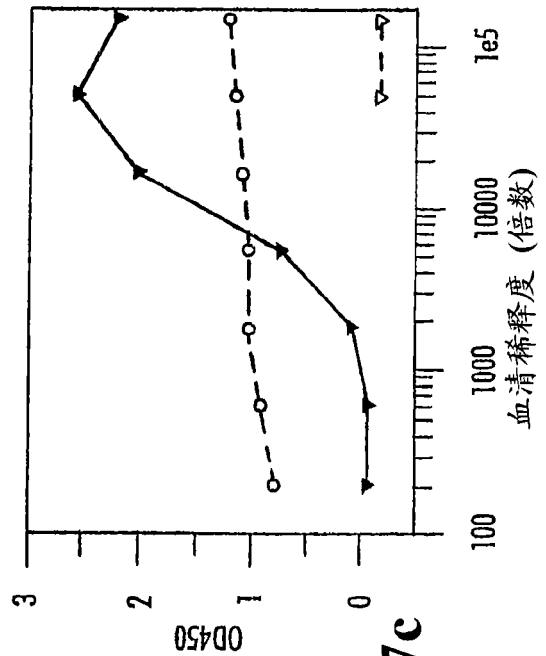


图 27c

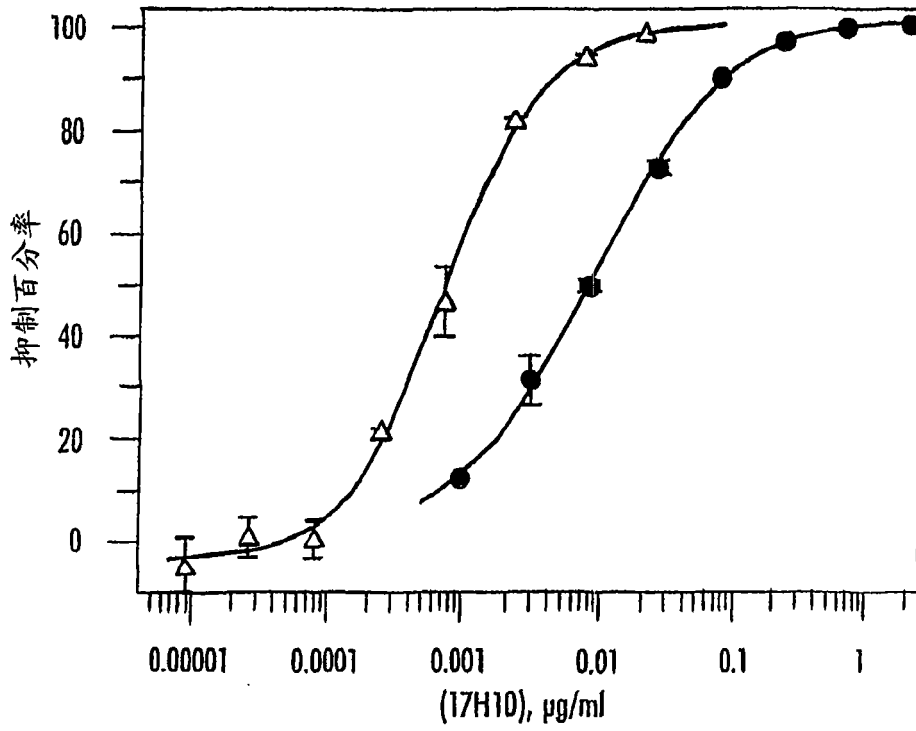


图 28a

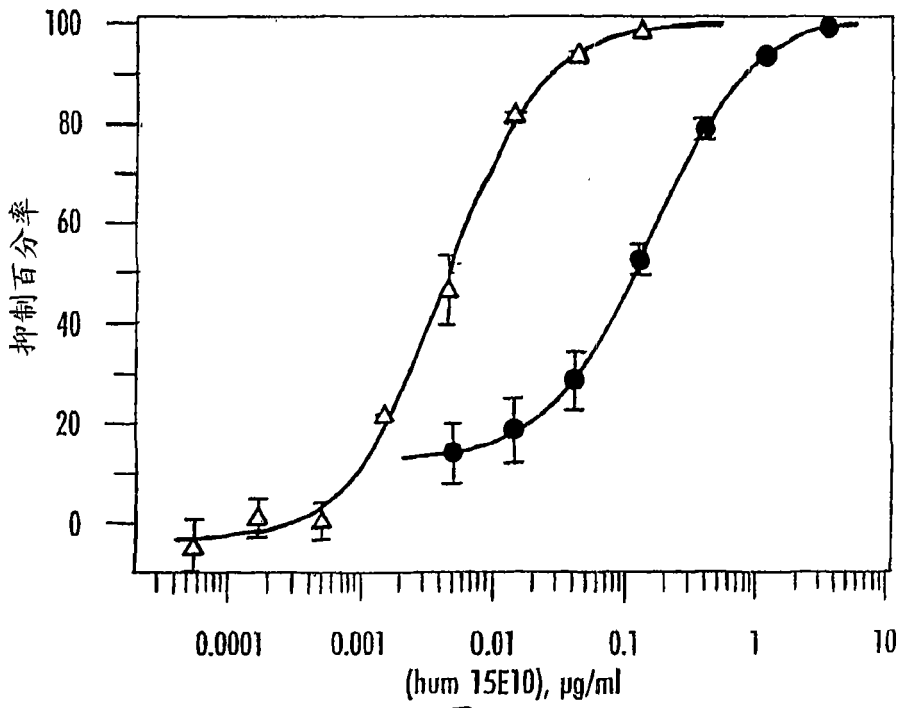


图 28b

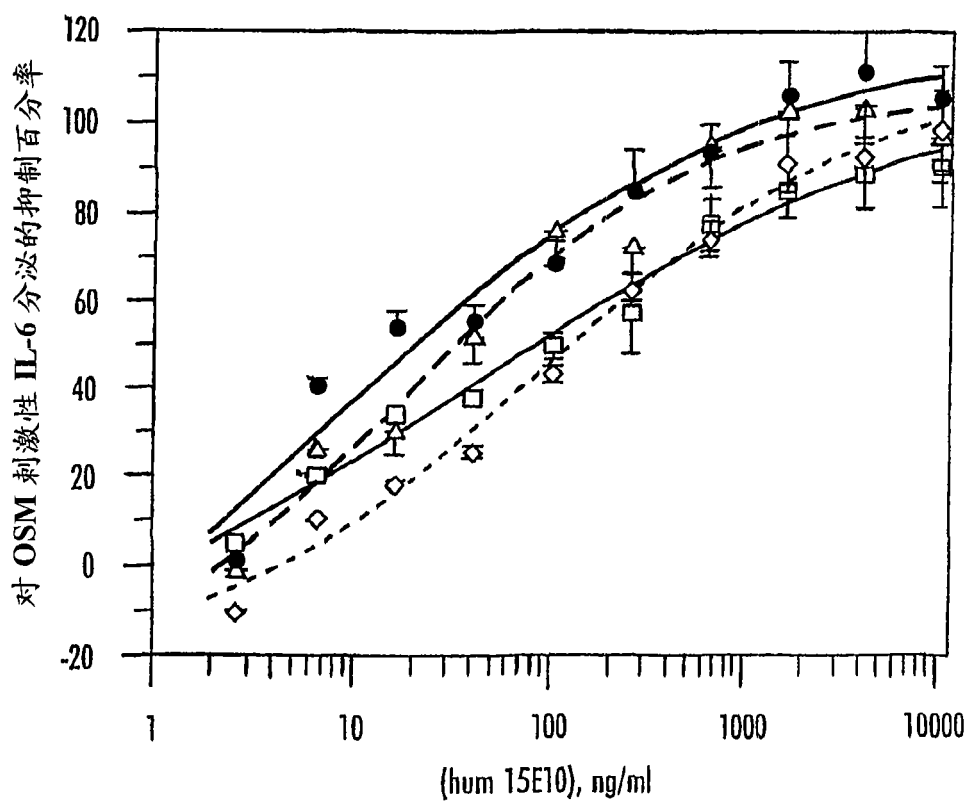


图 29

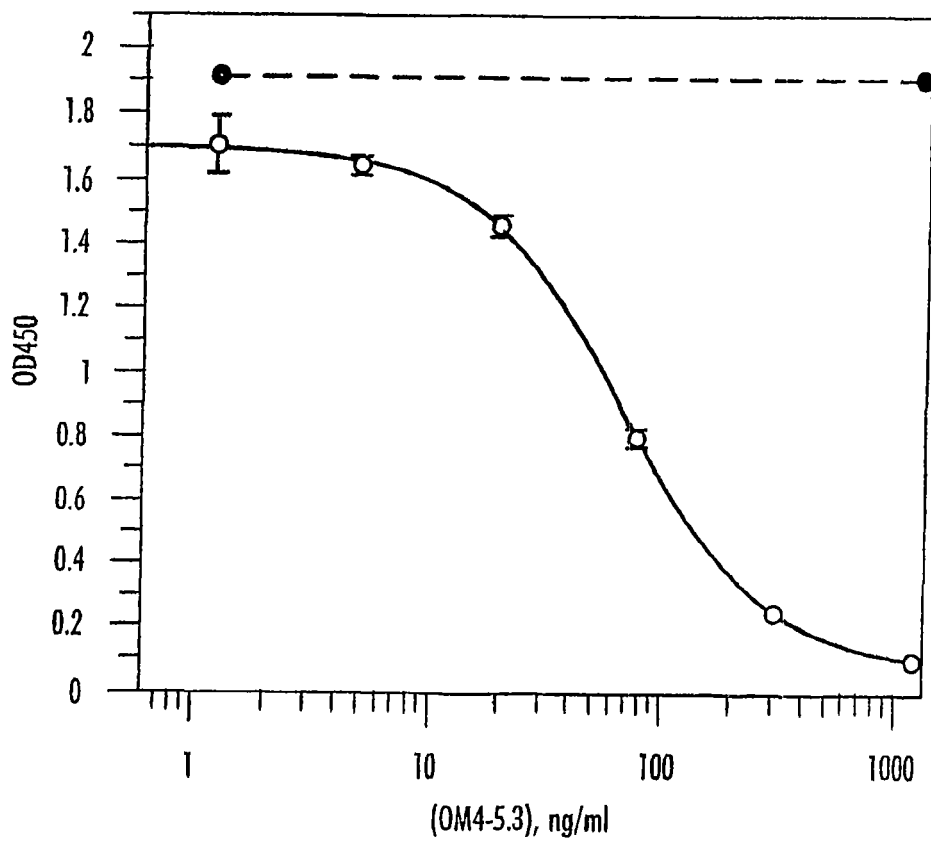


图 30

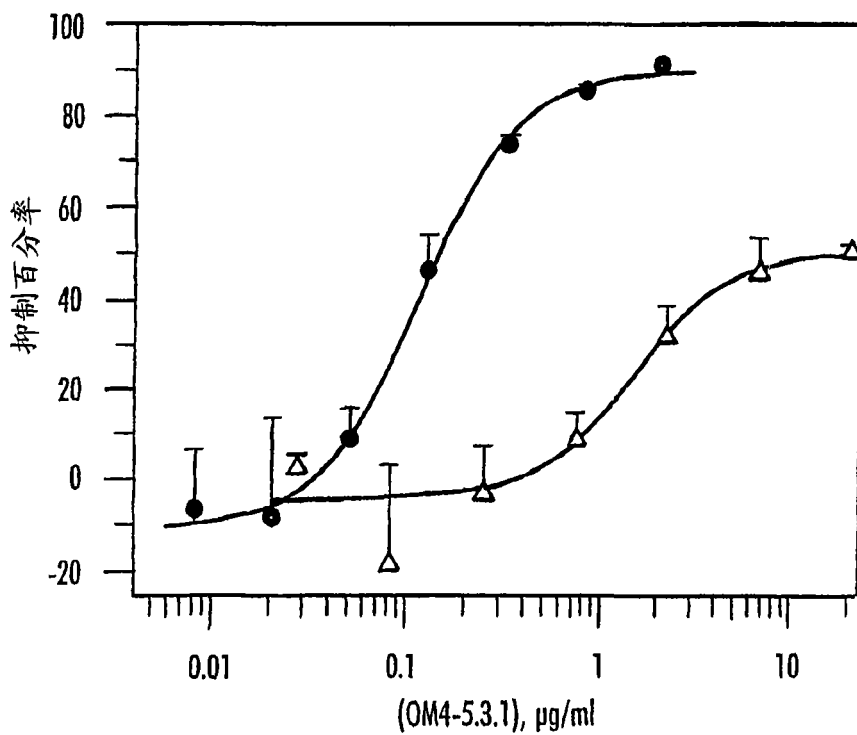


图 31a

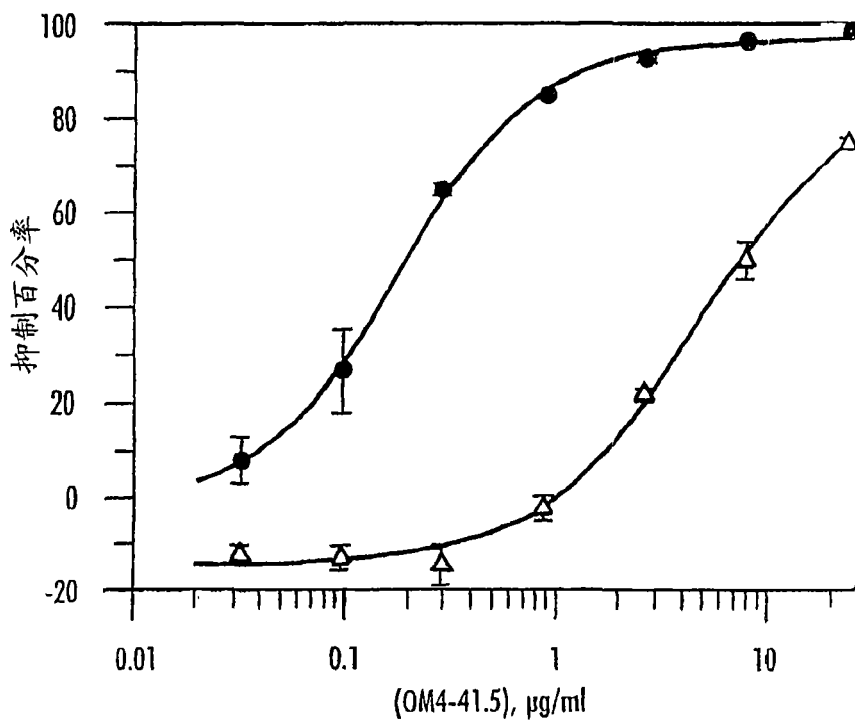


图 31b

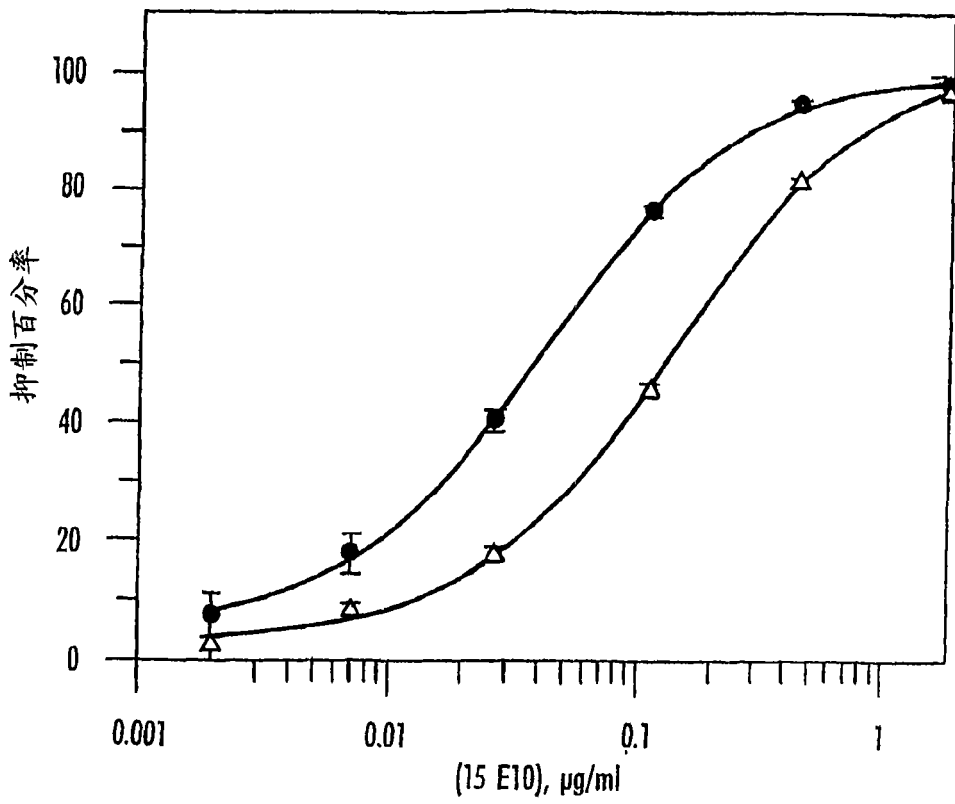


图 32a

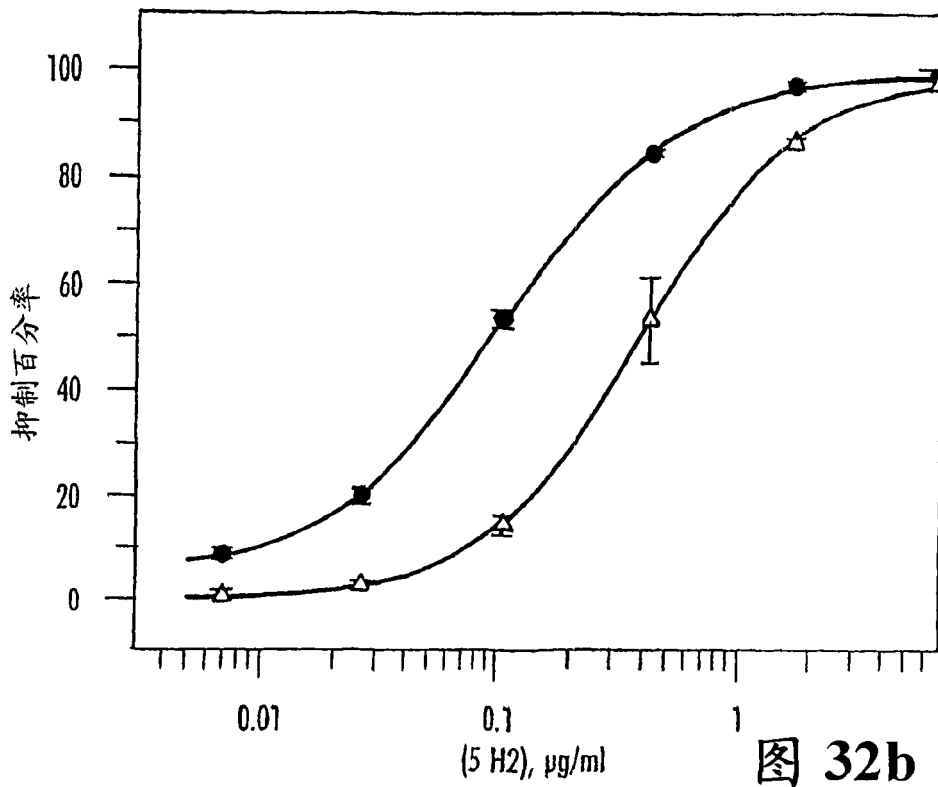


图 32b

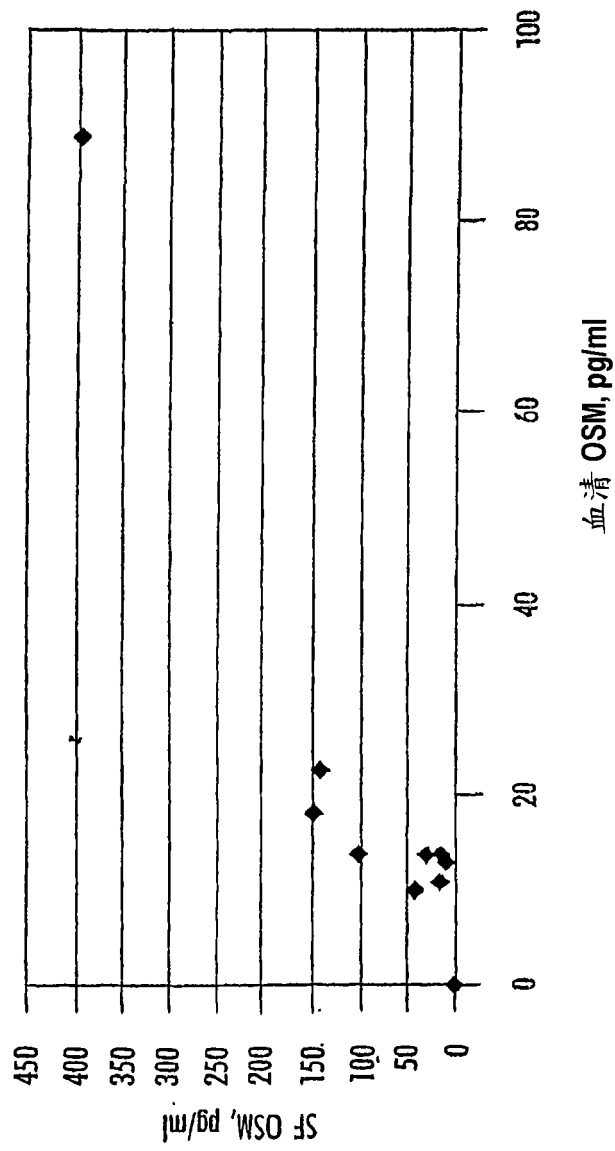


图 33

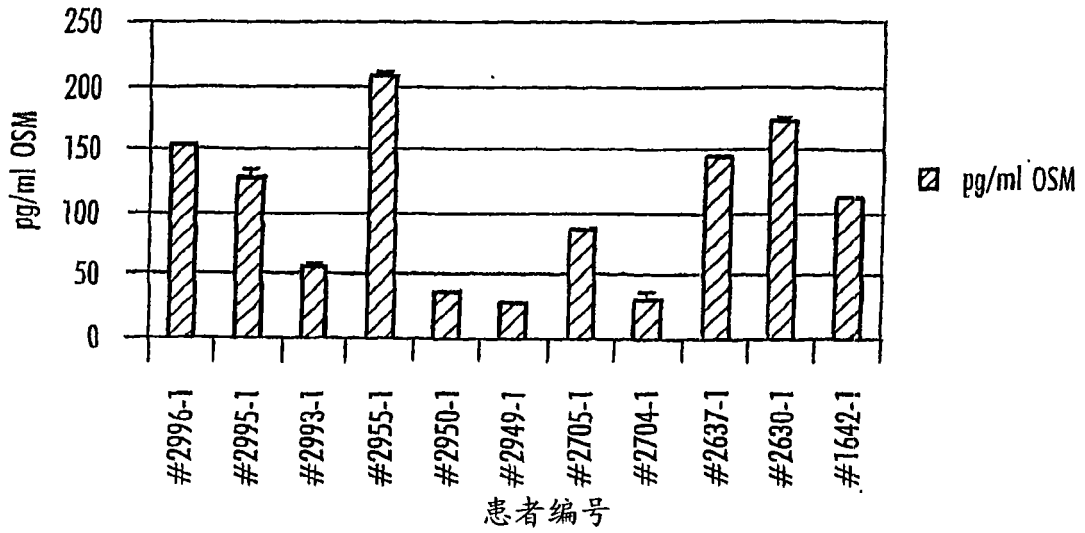


图 34a

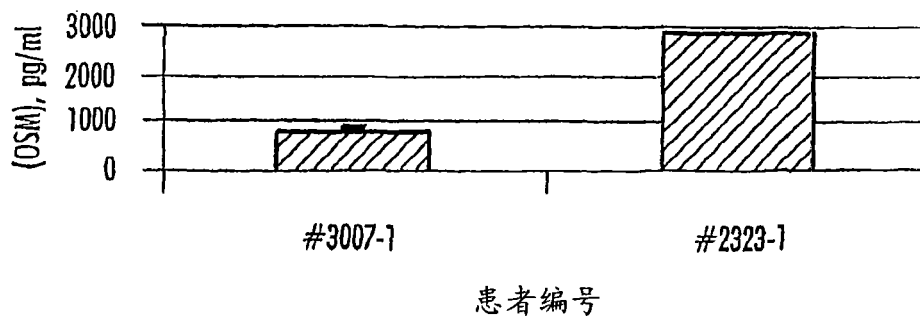


图 34b

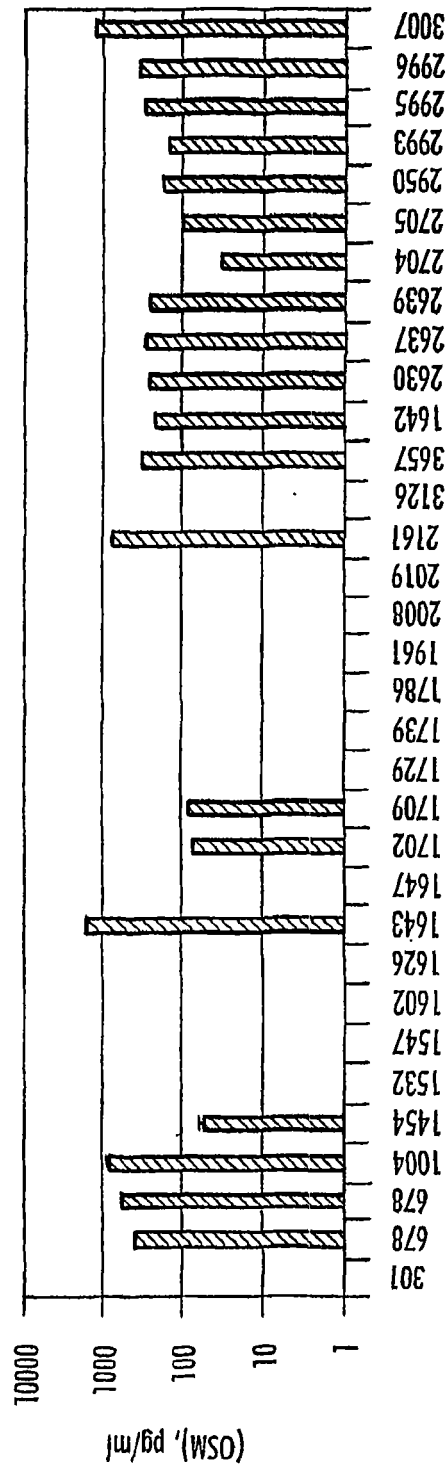


图 35

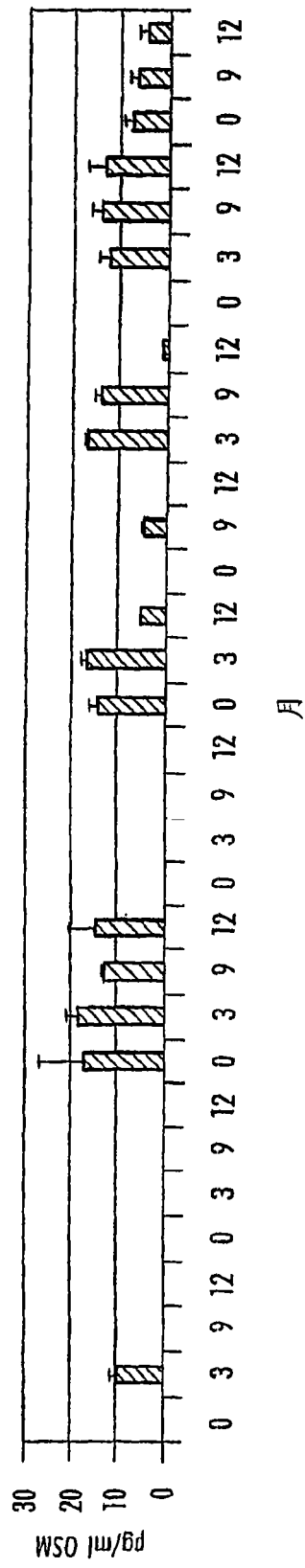


图 36

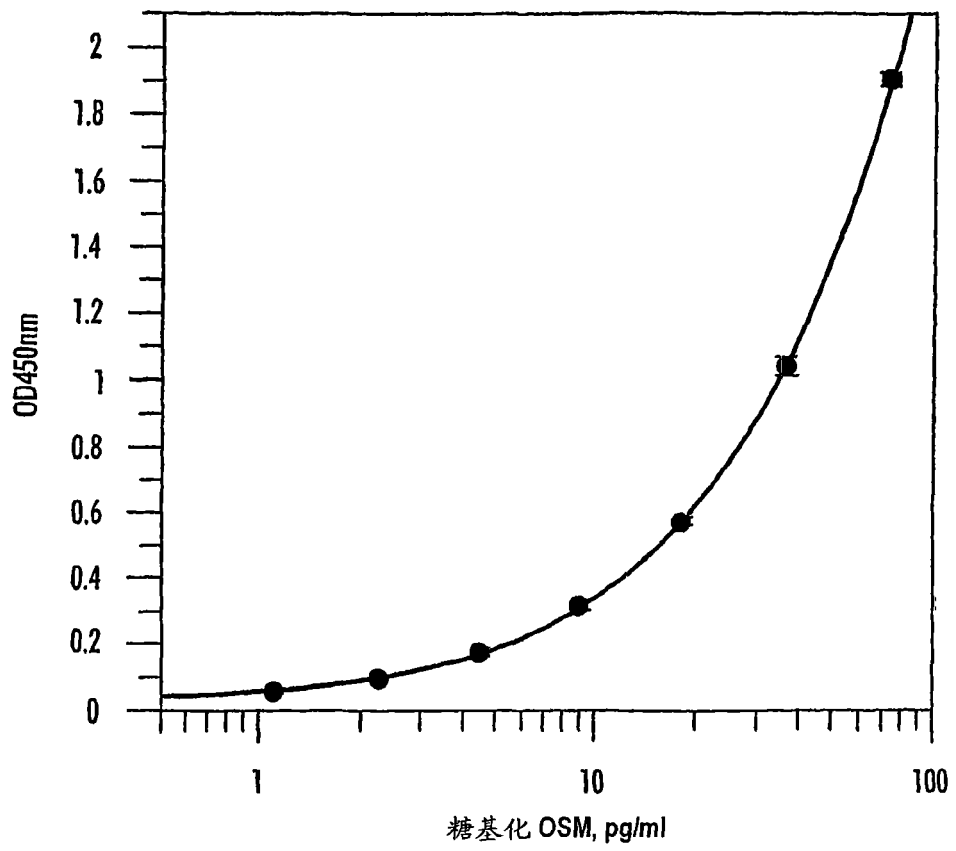


图 37

专利名称(译)	免疫球蛋白		
公开(公告)号	CN1997668A	公开(公告)日	2007-07-11
申请号	CN200580017434.1	申请日	2005-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	葛兰素集团有限公司		
申请(专利权)人(译)	葛兰素集团有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	葛兰素集团有限公司		
[标]发明人	JH埃利斯 A埃安·杜瓦尔 V杰马彻维斯基 C普鲁普顿 NT拉普森 MR韦斯特		
发明人	J·H·埃利斯 A·埃安·杜瓦尔 V·杰马彻维斯基 C·普鲁普顿 N·T·拉普森 M·R·韦斯特		
IPC分类号	C07K16/24 G01N33/53 A61K39/395		
代理人(译)	梁谋		
优先权	2004007193 2004-03-30 GB 2004007197 2004-03-30 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫球蛋白，例如抗体，其特异性结合制瘤蛋白M(OSM)，特别是人OSM(hOSM)，并调节OSM与gp130之间的相互作用。在典型的实施方案中，OSM被糖基化。本发明还涉及调节OSM的位点II和位点III二者与其对应互作配偶体之间的相互作用的抗体。本发明进一步公开了药用组合物、筛选方法和药物治疗方法。

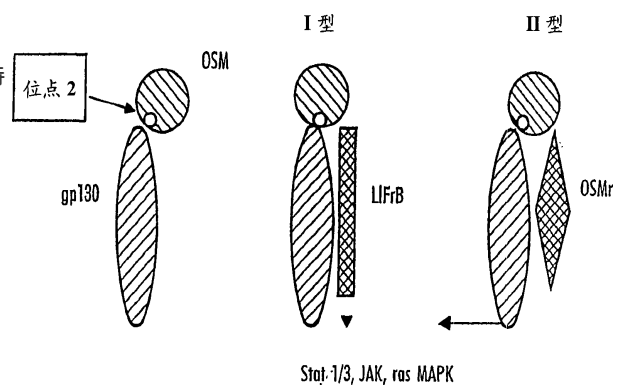


图 1